

10/517310

DT05 Rec'd PCT/PTO 17 DEC 2004

DOCKET NO.: 262507US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Hidehito KOTANI, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP03/07534

INTERNATIONAL FILING DATE: June 13, 2003

FOR: METHOD FOR PREDICTING A DRUG TRANSPORT CAPABILITY BY ABCG2
POLYMORPHISMS**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

COUNTRY
Japan**APPLICATION NO**
2002-175806**DAY/MONTH/YEAR**
17 June 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/JP03/07534. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

Corwin P. Umbach, Ph.D.
Registration No. 40,211

Customer Number

22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)

Rec'd PCT 17 DEC 2004

REC'D 15 AUG 2004

WIPO

PCT

10/517310

PCT/JP03/07534

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

13.06.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年 6月17日

出願番号
Application Number: 特願2002-175806
[ST. 10/C]: [JP2002-175806]

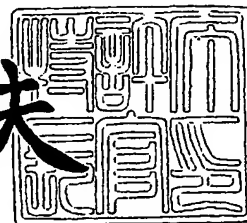
出願人
Applicant(s): 萬有製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 7月31日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【提出日】 平成14年 6月17日

【整理番号】 P7194GN

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68
C07H 21/04

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社つくば
研究所内

【氏名】 小谷 秀仁

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社つくば
研究所内

【氏名】 水洗 慎司

【特許出願人】

【識別番号】 000005072

【氏名又は名称】 萬有製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100080816

【弁理士】

【氏名又は名称】 加藤 朝道

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 030362

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ABCG2多型による薬物輸送能の予測方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳動物から試料を採取し、ABCG2遺伝子における核酸配列の多型、又は ABCG2ポリペプチドにおけるアミノ酸配列の多型を決定することを特徴とする哺乳動物細胞の薬物輸送能を予測する方法。

【請求項2】

前記ABCG2遺伝子が配列番号1の塩基配列からなるDNAを含み、前記核酸配列の多型が、配列番号1の34番目、376番目及び421番目からなる群より選択される位置における1以上の一塩基多型である請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記一塩基多型が、G34A、C376T及びC421Aからなる群より選択される一塩基多型である請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記核酸配列の多型が、ダイレクト・シーケンシング法、TaqMan法、インベーター法、質量分析法、RCA法、及びDNAチップ法からなる群より選択される何れか一つの方法を用いて決定されることを特徴とする請求項2又は3に記載の方法。

【請求項5】

前記ABCG2ポリペプチドが配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、前記アミノ酸配列の多型が配列番号2の12番目、126番目及び141番目からなる群より選択される位置における1以上のアミノ酸の多型である請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記アミノ酸の多型がVal12Met、若しくはGln141Lysのアミノ酸置換、又は126番目から下流のアミノ酸配列の欠失である請求項5に記載の方法。

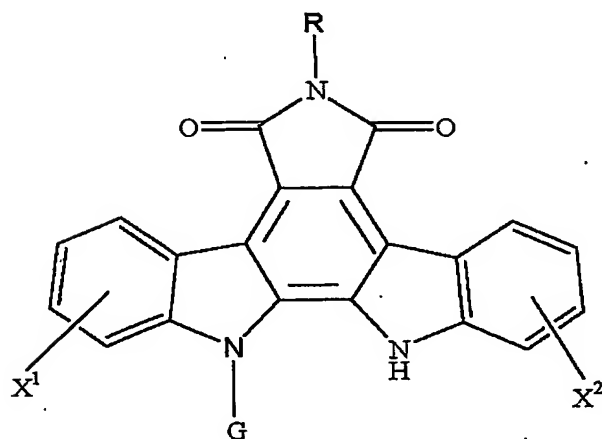
【請求項7】

前記アミノ酸配列の多型が質量分析法、二次元電気泳動法、及びプロテインチップ法からなる群より選択される何れか一つの方法を用いて決定することの特徴とする請求項 5 又は 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記薬物が、下記一般式 (I) で表される化合物である請求項 1 ~ 7 何れか一項に記載の方法。

【化 1】



(I)

[式中、X¹ 及び X² はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、又はヒドロキシ基を示し、R は低級アルキルアミノ基（ここで該低級アルキルアミノ基は、水素原子、アミノ基、ホルミルアミノ基、1 ないし 3 個のヒドロキシ基、置換基を有していてもよいピリジル基、又は置換基を有していてもよいチエニル基によって置換されていてもよい）であり、G は五炭糖基、又は六炭糖基（該五炭糖基、又は六炭糖基はアミノ基によって置換されていてもよい）を示す。]

【請求項 9】

配列番号 1 の 34 番目、376 番目、及び 421 番目からなる群より選択される 1 以上の位置における一塩基多型を有するポリヌクレオチドにおいて、前記いずれかの一塩基多型部位を含み、且つ、少なくとも 10 個の連続するヌクレオチド又はその相補的な配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項 10】

前記一塩基多型が G34A、C376T、C421A、及びそれらの相補的な

一塩基多型からなる群より選択される請求項 9 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 11】

配列番号 1 のポリヌクレオチドにおける塩基多型配列であって、該塩基多型配列の翻訳アミノ酸の 12 番目がメチオニンである塩基多型、126 番目が停止コドンである塩基多型、及び 141 番目がリジンである塩基多型からなる群より選択される 1 以上の塩基多型を有し、前記塩基多型部位の中に位置する 1 以上の塩基を含む、少なくとも 10 個の連続するヌクレオチド又はその相補的な配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項 12】

ABCG2 遺伝子と特異的にハイブリダイズし、前記遺伝子の一部からなる DNA 断片を増幅する PCR プライマー対であって、増幅された DNA 断片が、配列番号 1 に示す塩基配列の 34 番目、376 番目又は 421 番目の塩基を含むことを特徴とする PCR プライマー対。

【請求項 13】

前記 PCR プライマー対が配列番号 5 と 6、配列番号 9 と 10、配列番号 11 と 12 からなる群より選択される何れかのプライマー対である請求項 12 に記載の PCR プライマー対。

【請求項 14】

ABCG2 遺伝子と特異的にハイブリダイズし、配列番号 1 に示す塩基配列の 34 番目、376 番目又は 421 番目の位置における ABCG2 遺伝子の多型を検出することのできるポリヌクレオチド。

【請求項 15】

前記ポリヌクレオチドが、ダイレクト・シーケンシング法、インベーター法、RCA 法、質量分析法、TaqMan 法及び DNA チップ法からなる群より選択される何れか一つの方法において使用することのできる請求項 14 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 16】

以下の (a) 又は (b) に記載のポリペプチドに多型変異を有する変異体 ABCG2 ポリペプチドであって、配列番号 2 の 12 番目及び 141 番目の何れか又

は両方のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたポリペプチド、前記置換されたアミノ酸を含み前記変異体 A B C G 2 ポリペプチドの少なくとも 10 個の連続するアミノ酸配列からなるポリペプチド断片、又は配列番号 2 の 126 番目から下流のアミノ酸配列が欠失したポリペプチド。

(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるヒト A B C G 2 ポリペプチド

(b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、12 番目、126 番目及び 141 番目を除く 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ薬物輸送能を有する (a) の同質ポリペプチド

【請求項 17】

請求項 16 に記載の変異体 A B C G 2 ポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項 18】

以下の (a) 又は (b) に記載のポリペプチドにおいて、配列番号 2 に示すアミノ酸配列の V a l 12 M e t 及び G l n 141 L y s の何れか又は両方のアミノ酸置換を有する A B C G 2 ポリペプチドを発現する形質転換細胞。

(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるヒト A B C G 2 ポリペプチド

(b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、12 番目、126 番目及び 141 番目を除く 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ薬物輸送能を有する (a) の同質ポリペプチド

【請求項 19】

請求項 18 に記載の形質転換細胞を使用する薬物輸送活性測定方法。

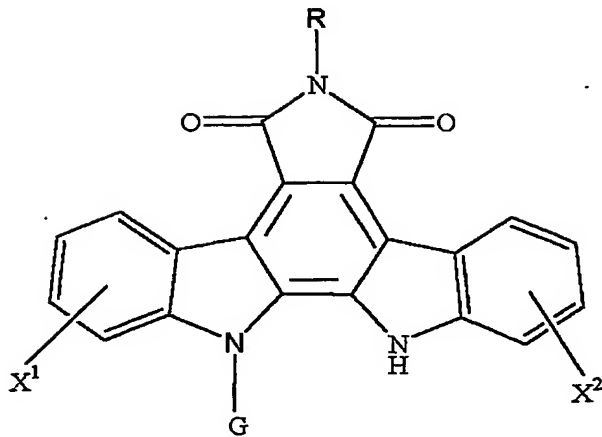
【請求項 20】

被験者から得た生物学的試料を分析し、請求項 9 ～ 11 何れかに記載のポリヌクレオチド、又は請求項 16 に記載のポリペプチドが存在するか否かを決定することを特徴とする薬物感受性の診断方法。

【請求項 21】

前記ポリヌクレオチド及び／又は前記ポリペプチドを有する被験者が、下記一般式 (I) で表される化合物に感受性であることを示唆する請求項 20 に記載の方法。

【化2】



(I)

[式中、X¹ 及び X² はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、又はヒドロキシ基を示し、R は低級アルキルアミノ基（ここで該低級アルキルアミノ基は、水素原子、アミノ基、ホルミルアミノ基、1ないし3個のヒドロキシ基、置換基を有していてもよいピリジル基、又は置換基を有していてもよいチエニル基によって置換されていてもよい）であり、G は五炭糖基、又は六炭糖基（該五炭糖基、又は六炭糖基はアミノ基によって置換されていてもよい）を示す。]

【請求項22】

以下の（a）～（f）の何れか1以上を含むことを特徴とする薬物感受性の診断キット。

- （a）請求項9～11何れか一項に記載のポリヌクレオチド
- （b）請求項12又は13に記載のプライマー対
- （c）請求項14又は15に記載のポリヌクレオチド
- （d）請求項16に記載のポリペプチド
- （e）請求項17に記載の抗体
- （f）請求項18に記載の形質転換細胞

【請求項23】

以下の（a）～（c）を含んでなるABC G2多型データを解析するためのコンピュータシステム。

- （a）入出力装置

(b) 多型データを含む記憶媒体

(c) 中央演算処理装置

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、癌化学療法剤等の薬物を細胞から排出するポリペプチド及びこれをコードする遺伝子に関し、より詳しくはA B C G 2 遺伝子の一塩基多型、及び／又はA B C G 2 ポリペプチドのアミノ酸多型を決定することによる哺乳動物細胞の薬物輸送能を予測する方法、並びにその方法に使用するポリヌクレオチド、ポリペプチド及びキット等に関する。

【0002】

【従来の技術】

癌化学療法剤に対する感受性の予測は、従来の癌化学療法剤による癌治療における課題である。癌細胞の違い及び患者個人の体質の違いによって、化学療法剤の抗腫瘍活性は大きく異なる。化学療法剤は、患者によって高い効果が得られる場合と、耐性を示す場合とがある。また、腫瘍は最初は化学療法剤に良く反応するが、後には様々な薬剤に対しても耐性になる。しかし、従来法では、特定の患者に対し化学療法剤が有効であるかどうかを判断することは非常に困難であった。

【0003】

このような化学療法剤感受性の主要な原因として、薬剤排出能の違いによる細胞内薬剤濃度の違いがあげられる。これらの癌細胞において化学療法剤を細胞外へ排出する輸送体はいずれもA B C 輸送体スーパーファミリー (ATP-binding cassette transporter superfamily) の一員であり、細胞膜に局在しA T P の加水分解を利用して基質を輸送する一群の分子である。

【0004】

該輸送体の代表例としてMDR 1 遺伝子にコードされるP-糖タンパク質（以下、「P-gp」と称する）及びMRP1、MRP2、MRP3などのMRPサブファミリー遺伝子にコードされる多薬剤耐性関連タンパク質（以下、「MRP

」と称する)が報告されている。P-gpは多くの腫瘍タイプの多剤耐性に関係するとして古くから知られた分子ポンプであり、またMRPは最初に肺癌における多剤耐性に関係することから判明し、後に他の癌タイプでも発現することが判明した(Cole, S. P. C. et al., Science 258, 1650-1654 (1992)、及びLeslie E.M. et al., Toxicology 167, 3-23 (2001))輸送体である。

【0005】

近年、新たなABCファミリー分子が次々と発見され、P-gpやMRPの他にも薬剤耐性への関与が示唆される分子ポンプが明らかになりつつある。このような分子の一つとして、ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP)と称される分子ポンプがある。これらには胎盤特異的に発現する遺伝子としてABCP (Allikmets, R. et al., Cancer Res. 58, 5337-5339 (1998))、アドリアマイシンで選択した耐性細胞株から取得された遺伝子としてBCRP (Doyle, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 15665-15670 (1998))、及びミトキサントロンで選択した耐性細胞株から取得された遺伝子としてMXR (Miyake, K. et al., Cancer Res. 59, 8-13 (1999))が各々ABCP、BCRP及びMXRと命名され報告された。これら3種の遺伝子は各遺伝子間で塩基置換に由来する1ないし4アミノ酸の相違がみとめられる。

【0006】

BCRPとして報告された配列をMCF-7細胞に導入、発現させた細胞株の解析から、この遺伝子の発現がミトキサントロンやアドリアマイシンに耐性を付与することが示され、新たな多剤耐性因子として注目されている(Doyle, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 15665-15670 (1998))(WO 99/40110)。

【0007】

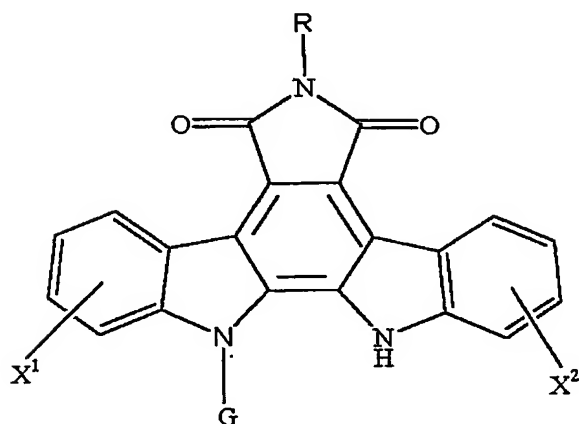
このような状況で本出願人は、インドロカルバゾール系化合物の排出ポンプが配列番号1のABCG2遺伝子であることを見いだした(Komatani, H. et al., Cancer Research, 61, 2827-2832 (2001), W002/28894)。BCRPとして報告された遺伝子は482番目のコドンがスレオニンをコードしているのに対し、該配列番号1のABCG2遺伝子は482番目のコドンがアルギニンをコードして

いる新規な塩基配列であった。

【0008】

配列番号1のABC G 2遺伝子は、下記の一般式(I)：

【化3】



(I)

[式中、 X^1 及び X^2 はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、又はヒドロキシ基を示し、 R は低級アルキルアミノ基（ここで該低級アルキルアミノ基は、水素原子、アミノ基、ホルミルアミノ基、1ないし3個のヒドロキシ基、置換基を有していてもよいピリジル基、又は置換基を有していてもよいチエニル基によって置換されていてもよい。）であり、 G は五炭糖基、又は六炭糖基（該五炭糖基、又は六炭糖基はアミノ基によって置換されていてもよい。）を示す。] で表される化合物（以下、「インドロカルバゾール系化合物」と総称する。）、例えば、化合物A（前記一般式(I)において、 X^1 は1-ヒドロキシ基、 X^2 は1-ヒドロキシ基、 R はホルミルアミノ基、 G は β -D-グルコピラノシル基を示す。）及び化合物B（前記一般式(I)において、 X^1 は2-ヒドロキシ基、 X^2 は10-ヒドロキシ基、 R は（1-ヒドロキシメチル-2-ヒドロキシ）エチルアミノ基、 G は β -D-グルコピラノシル基を示す。）等を選択的な耐性を細胞に付与する遺伝子である。

【0009】

例えば、配列番号1のABC G 2遺伝子は、すべての化合物A及び化合物B（Yoshinari, T. et al., Cancer Res. 59, 4271-4275 (1999)）に対する耐性細胞

で高発現していることがノーザンブロッティング解析により示されており、かつ、化合物 A 及び化合物 B 等によって代表されるインドロカルバゾール化合物に選択的に、細胞内への化合物蓄積を抑制する (Komatani H. et al., Cancer Res. 61, 2827-2832 (2001), WO 02/28894)。従って、配列番号 1 の ABCG2 遺伝子を含む ABCG2 の活性又は発現に影響を及ぼす遺伝子多型を解析することは、治療に用いる抗癌剤の選択に有用であると考えられる。しかしながら、このような遺伝子多型は、これまで知られていない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

かかる状況下において、個々の患者において化学療法薬剤を細胞外へ排出する輸送体遺伝子の排出能力を診断する方法の開発が望まれている。例えば、アドリアマイシン、ドキシソルビシン及びミトキサントロン等のアントラキノン (anthraquinone) 骨格を持つ癌化学療法剤は、前記 P-gp、前記 MRP 又は前記 BCRP の高発現が検出される場合には、十分に有効であるとは言えない。

【0011】

インドロカルバゾール系化合物は、前記 P-gp 又は前記 MRP の発現の有無に関わらず有効な抗癌剤であるが、ABCG2 が高発現している癌細胞に対しては効果は低い。

【0012】

しかしながら、ABCG2 の活性又は発現に影響を及ぼす遺伝子多型をあらかじめ検出することができれば、癌治療における抗癌剤の選択や、癌治療において併用する ABCG2 活性阻害剤の選択に有用である。

【0013】

例えば、広く見いだされる配列番号 1 の ABCG2 遺伝子がインドロカルバゾール系化合物に選択的な耐性を細胞に付与する遺伝子であるのに対してその 482 番目のアミノ酸がスレオニンに変異した遺伝子である ABCG2-Thr482 遺伝子はインドロカルバゾール系化合物に加えてミトキサントロンやアドリアマイシンに対しても耐性を付与するので、これらの両遺伝子の違いを検出する方法は、癌治療における抗癌剤の選択に有用である。

【0014】

また、例えば、ABCG2の活性を低下させるようなABCG2遺伝子多型をあらかじめ検出することは、癌治療におけるインドロカルバゾール系化合物の最適投与量を見いだすのに有用である。

【0015】

従って、本発明は、インドロカルバゾール系化合物の細胞内蓄積に関連するABCG2ポリペプチドとそれをコードするポリヌクレオチドの多型を提供することを課題とする。また、本発明は癌患者由来の被験試料におけるABCG2ポリペプチド又はそれをコードするポリヌクレオチドの多型の有無を、ABCG2ポリペプチドに対する抗体又はABCG2関連遺伝子の多型に特異的な核酸を用いて検出する方法を提供することを課題とする。さらに、本発明はABCG2ポリペプチド又はそれをコードするポリヌクレオチドの多型の有無を検出することにより、インドロカルバゾール系化合物の効果的な使用方法を提供することを課題とする。

【0016】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために、本発明者らは数多くのヒト癌細胞株及び臨床サンプルから抽出したゲノムDNAを解析してABCG2遺伝子における一塩基多型(SNPs)を同定した。これらのSNPsは、ABCG2ポリペプチドの特定部位のアミノ酸置換や欠失等の変異を起こすことが分かった。そこで、特定の変異型ABCG2ポリペプチドを発現する細胞株を作製してその薬剤耐性能を調べたところ、変異型ABCG2ポリペプチドの薬物輸送能が野生型ABCG2に比べて著しく低下していることを見出し、これらの知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【0017】

すなわち、本発明はその第一の視点において、哺乳動物から試料を採取し、ABCG2遺伝子における核酸配列の多型、又はABCG2ポリペプチドにおけるアミノ酸配列の多型を決定することを特徴とする哺乳動物細胞の薬物輸送能を予測する方法を提供する。

【0018】

本発明の好ましい実施形態において、前記A B C G 2 遺伝子は配列番号1の塩基配列からなるDNAを含み、前記核酸配列の多型が、配列番号1の34番目、376番目及び421番目からなる群より選択される位置における1以上の一塩基多型である。更に、前記一塩基多型は、G34A、C376T及びC421Aからなる群より選択される一塩基多型であることが好ましい。ここで、「G34A」とは、34番目のグアニンがアデニンに置換したことを、「C376T」とは、376番目のシトシンがチミンに置換したことを、及び「C421A」とは、421番目のシトシンがアデニンに置換したことを示す。また、前記核酸配列の多型は、ダイレクト・シーケンシング法、TaqMan法、インベーター法、質量分析法、RCA法、及びDNAチップ法からなる群より選択される何れか一つの方法を用いて決定することができる。

【0019】

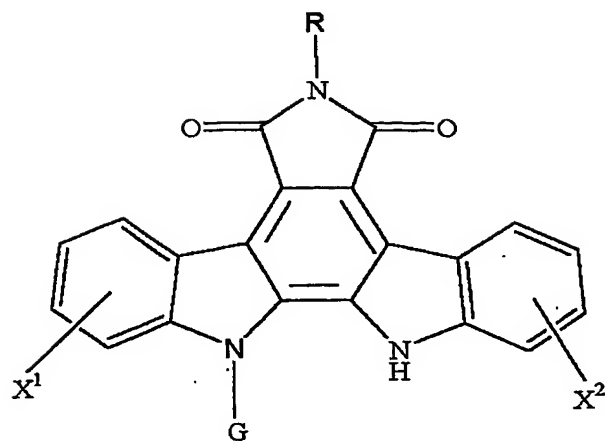
本発明の他の好ましい実施形態において、前記A B C G 2 ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、前記アミノ酸配列の多型が配列番号2の12番目、126番目及び141番目からなる群より選択される位置における1以上のアミノ酸の多型である。更に、前記アミノ酸の多型は、Val12Met、若しくはGln141Lysのアミノ酸置換、又は126番目から下流のアミノ酸配列の欠失であることが好ましい。また、前記アミノ酸配列の多型は、質量分析法、二次元電気泳動法、及びプロテインチップ法からなる群より選択される何れか一つの方法を用いて決定することができる。

【0020】

本発明のなお好ましい実施形態において、前記薬物は下記一般式(I)で表される化合物(以下、「インドロカルバゾール系化合物」と総称する)である。

【0021】

【化 4】



(I)

〔式中、 X^1 及び X^2 はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、又はヒドロキシ基を示し、 R は低級アルキルアミノ基（ここで該低級アルキルアミノ基は、水素原子、アミノ基、ホルミルアミノ基、1 ないし 3 個のヒドロキシ基、置換基を有していてもよいピリジル基、又は置換基を有していてもよいチエニル基によって置換されていてもよい）であり、 G は五炭糖基、又は六炭糖基（該五炭糖基、又は六炭糖基はアミノ基によって置換されていてもよい）を示す。〕

【0022】

本発明の第 2 の視点において、配列番号 1 の 34 番目、376 番目、及び 421 番目からなる群より選択される 1 以上の位置における一塩基多型を有するポリヌクレオチドにおいて、前記いずれかの一塩基多型部位を含み、且つ、少なくとも 10 個の連続するヌクレオチド又はその相補的な配列からなるポリヌクレオチドが提供される。好ましい実施形態において、前記一塩基多型は、G34A、C376T、C421A、及びそれらの相補的な一塩基多型からなる群より選択される。

【0023】

一つの実施形態において、配列番号 1 のポリヌクレオチドにおける塩基多型配列であって、該塩基多型配列の翻訳アミノ酸の 12 番目がメチオニンである塩基多型、126 番目が停止コドンである塩基多型、及び 141 番目がリジンである塩基多型からなる群より選択される 1 以上の塩基多型を有し、前記塩基多型部位

の中に位置する 1 以上の塩基を含む、少なくとも 10 個の連続するヌクレオチド又はその相補的な配列からなるポリヌクレオチドが提供される。

【0024】

本発明の第 3 の視点において、A B C G 2 遺伝子と特異的にハイブリダイズし、前記遺伝子の一部からなる DNA 断片を増幅する P C R プライマー対であって、増幅された DNA 断片が、配列番号 1 に示す塩基配列の 3 4 番目、3 7 6 番目又は 4 2 1 番目の塩基を含むことを特徴とする P C R プライマー対が提供される。好ましい実施形態において、前記 P C R プライマー対は、配列番号 5 と 6、配列番号 9 と 10 及び配列番号 11 と 12 からなる群より選択される何れかのプライマー対である。

【0025】

本発明の第 4 の視点において、A B C G 2 遺伝子と特異的にハイブリダイズし、配列番号 1 に示す塩基配列の 3 4 番目、3 7 6 番目又は 4 2 1 番目の位置における A B C G 2 遺伝子の多型を検出することのできるポリヌクレオチドが提供される。好ましい実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、ダイレクト・シーケンシング法、T a q M a n 法、インベーター法、質量分析法、R C A 法、及び DNA チップ法からなる群より選択される何れか一つの方法において使用することができる。

【0026】

更に、本発明の第 5 の視点において、(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるヒト A B C G 2 ポリペプチド、又は (b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、1 2 番目、1 2 6 番目及び 1 4 1 番目を除く 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ薬物輸送能を有する (a) の同質ポリペプチド、に多型変異を有する変異体 A B C G 2 ポリペプチドであって、配列番号 2 の 1 2 番目及び 1 4 1 番目の何れか又は両方のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたポリペプチド、前記置換されたアミノ酸を含み前記変異体 A B C G 2 ポリペプチドの少なくとも 10 個の連続するアミノ酸配列からなるポリペプチド断片、又は配列番号 2 の 1 2 6 番目から下流のアミノ酸配列が欠失したポリペプチドが提供される。

【0027】

本発明の第6の視点において、前記第5の視点における変異体A B C G 2ポリペプチドに特異的に結合する抗体が提供される。

【0028】

本発明の第7の視点において、(a) 配列番号2に示すアミノ酸配列からなるヒトA B C G 2ポリペプチド、又は(b) 配列番号2に示すアミノ酸配列において、12番目、126番目及び141番目を除く1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ薬物輸送能を有する(a) の同質ポリペプチドにおいて、配列番号2に示すアミノ酸配列のV a l 1 2 M e t 及びG l n 1 4 1 L y s の何れか又は両方のアミノ酸置換を有するA B C G 2ポリペプチドを発現する形質転換細胞が提供される。

【0029】

本発明の第8の視点において、前記第7の視点における形質転換細胞を使用する薬物輸送活性測定方法が提供される。

【0030】

本発明の第9の視点において、被験者から試料を採取し、前記第2の視点におけるポリヌクレオチド、又は前記第5の視点におけるポリペプチドが存在するかどうかを決定することを特徴とする薬物感受性の診断方法が提供される。好ましい実施形態において、前記ポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドを有する被験者は、前記インドロカルバゾール系化合物に感受性であることが示唆される。

【0031】

本発明の第10の視点において、前記第2の視点におけるポリヌクレオチド、前記第3の視点におけるプライマー対、前記第4の視点におけるポリヌクレオチド、前記第5の視点におけるポリペプチド、前記第6の視点における抗体、及び前記第7の視点における形質転換細胞の何れか1以上を含むことを特徴とする薬物感受性の診断キットが提供される。

【0032】

更に、本発明の第11の視点において、(a) 入出力装置、(b) 多型データを含む記憶媒体、及び(c) 中央演算処理装置を含んでなるA B C G 2多型デー

タを解析するコンピュータシステムが提供される。

【0033】

【発明の実施の形態】

(定義)

本明細書において、以下の用語は特記しない限り次のように定義される。「ABC₂」とは、ABC輸送体スーパーファミリーに属する一つの分子ポンプであって、癌化学療法剤を細胞から排出するポリペプチド又はこれをコードする遺伝子の名称である。遺伝子とはcDNA、及びゲノム遺伝子を含む。

【0034】

「多型」(polymorphism)とは、遺伝子やポリペプチド又はその一部において2以上の型が存在することをいう。少なくとも2つの異なる型、即ち、異なる塩基配列を有する遺伝子断片を「遺伝子の多型部位」という。多型部位は一塩基対の場合も、或は一定の長さの塩基対の場合もある。1個の塩基が他の塩基に置き換わっているものを一塩基多型(SNP)といい、SNPはヒトゲノムにおいては数百塩基対から1000塩基対に1ヶ所の割合で存在すると推測されている。また、この他に2塩基から数十塩基を1単位とする配列が繰返し存在する部位において、その繰返し回数が個人間で異なるものも存在し、VNTR(variable number of tandem repeats)やマイクロサテライト多型と呼ばれている。SNPはその存在する位置によって機能が異なり、ポリペプチドの翻訳領域に存在してアミノ酸配列の置換や欠失を引き起こし、遺伝子の機能に影響を与えるものや、プロモーターやイントロン等の発現調節領域に存在して遺伝子発現量に影響を与えるもの、あるいは他の領域に存在して遺伝子発現への影響はほとんど無いもの等がある。

【0035】

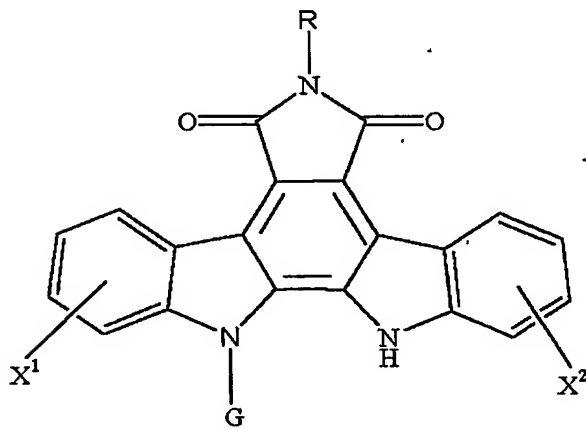
本明細書において、「哺乳動物細胞」とは、哺乳類に属する動物の生体を構成している組織、細胞、又はそれらの細胞を体外培養したものを意味する。また、「試料」とは、生物に由来するポリヌクレオチドを含有する試料であって、種々の組織や細胞から採取される、生きている、若しくは死滅した、又は考古学的な試料をも含む。具体的には体液(血液、尿、唾液等)、皮膚、毛根、粘膜、内臓、

胎盤、臍帯血等である。

【0036】

本明細書において、「薬物」とは生理活性のある生体異物を意味し、癌の治療の目的で用いられる癌化学療法剤を含む。合成化合物、植物若しくは微生物由来の天然化合物、又は前記天然化合物をもとに合成される半合成化合物が含まれる。好ましくは、下記一般式 (I) :

【化5】



(I)

[式中、X¹ 及び X² はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、又はヒドロキシ基を示し、R は低級アルキルアミノ基 (ここで該低級アルキルアミノ基は、水素原子、アミノ基、ホルミルアミノ基、1 ないし 3 個のヒドロキシ基、置換基を有していてもよいピリジル基、又は置換基を有していてもよいチエニル基によって置換されていてもよい) であり、G は五炭糖基、又は六炭糖基 (該五炭糖基、又は六炭糖基はアミノ基によって置換されていてもよい) を示す。] で表される化合物 (以下、「インドロカルバゾール系化合物」と総称する。) を意味し、さらに好ましくは該一般式 (I) において、[式中、X¹ および X² はそれぞれ独立に、ハロゲン原子又はヒドロキシ基を示し、R は水素原子、ホルミルアミノ基、又は 1 ないし 3 個のヒドロキシ基、置換基を有していてもよいピリジル基および置換基を有していてもよいチエニル基からなる群から選ばれる置換基によって置換されてもよい低級アルキルアミノ基であり、G はアミノ基によって置換を有されてもよい六炭糖基を示す。] で表される化合物を意味する。上記のインドロカルバゾール系化合物の製造方法等については、先の特許出願・特許 (ヨーロ

ツパ特許公開公報 0528030A1、米国特許第5591842号明細書、米国特許第5668271号明細書、米国特許第5804564号明細書、WO95/30682、WO96/04293、WO98/07433、特開平10-245390)で開示されている。特に化合物A及び化合物Bの製造方法については、それぞれ特開平6-128283及びWO95/30682で開示されている。

【0037】

本明細書において「ポリヌクレオチド」とは一般に、ポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドのいずれをもいい、それらは非修飾RNAまたはDNA、あるいは修飾RNAまたはDNAであってもよく、例えばDNA、cDNA、ゲノムDNA、mRNA、未プロセッシングRNAおよびそれらの断片などが挙げられ、それらの長さは特に限定しないが、一般的には約10塩基以上をいう。一方、「ポリヌクレオチド」よりも比較的短いものを「オリゴヌクレオチド」という場合もあり、「オリゴヌクレオチド」の長さは、一般的には、約50塩基以下である。

【0038】

本明細書において「ポリペプチド」とは、2個以上のアミノ酸がペプチド結合で連結されたものであり、比較的短鎖のペプチド又はオリゴペプチドと呼ばれるものからタンパク質と呼ばれる長鎖のものまでを含む。ポリペプチドには、遺伝的にコードされている20種類のアミノ酸以外のアミノ酸が含まれていてもよい。また、修飾されたアミノ酸を含むことがあり得る。これらの修飾アミノ酸は生体内において、例えば、翻訳後のプロセッシングにおいて、或は、当業者に公知の化学修飾法によって生成される。これらの修飾は、ペプチド結合の主鎖、アミノ酸側鎖、アミノ末端、又はカルボキシル末端において起こり得、例えば、アセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、ビオチン化、脂質や脂質誘導体との共有結合、架橋結合の生成、ジスルフィド結合、糖鎖の付加、GPIアンカーの付加、リン酸化及びプレニル化等を含む。

【0039】

(薬物輸送能の予測方法)

本発明の一つの実施形態において、哺乳動物から試料を採取し、A B C G 2 遺伝子における核酸配列の多型、又はA B C G 2 ポリペプチドにおけるアミノ酸配列の多型を決定することを特徴とする哺乳動物細胞の薬物輸送能を予測する方法が提供される。ここで、A B C G 2 遺伝子とは、化合物Aによって代表されるインドロカルバゾール系化合物への耐性を細胞に付与する遺伝子である配列番号1に示された塩基配列のヒト由来 cDNA を含む。更に、配列番号1の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ薬物輸送能を有するポリペプチドをコードするヒト由来の同質遺伝子、及び哺乳動物におけるそれらの相同物も含まれる。「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」という条件は当業者において周知のハイブリダイゼーションの実験条件である。具体的には、2つの核酸断片が、サムブルックら(Sambrook, J.)の「大腸菌におけるクローン遺伝子の発現(Expression of cloned genes in E.coli)」(Molecular Cloning:A laboratory manual:2nd. edition(1989))Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 9.47-9.62および11.45-11.61に記載されたハイブリダイゼーション条件下で、相互にハイブリダイズすることを意味する。

【0040】

より具体的には、「ストリンジェントな条件」とは約45℃にて6.0×SSCでハイブリダイゼーションを行った後に、50℃で2.0×SSCで洗浄することを指す。ストリンジェンシーの選択のため、洗浄工程における塩濃度を、例えば低ストリンジェンシーとしての約2.0×SSC、50℃から、高ストリンジェンシーとしての約0.2×SSC、50℃まで選択すること、ができる。さらに、洗浄工程の温度を低ストリンジェンシー条件の室温、約22℃から、高ストリンジェンシー条件の約65℃まで増大させることができる。なお、当業者であれば、SSCの希釈率、ホルムアミド濃度、温度などの諸条件を適宜選択することで、上記の条件と同様のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を実現することができる。従って、この同質遺伝子には、従来から公知の種々の変異体遺伝子も含まれる。例えば、アドリアマイシン耐性細胞株から取得されたBCRP遺伝子、胎盤特異的に発現するABCP遺伝子、及びミトキサントロ

ンで選択した耐性細胞株から取得されたMXR遺伝子は、配列番号1のヒトABCG2遺伝子とは数個の塩基配列が異なるが、何れも配列番号1のABCG2遺伝子の同質遺伝子であり、本発明における「ABCG2遺伝子」に含まれるものである。

【0041】

ABCG2ポリペプチドとは、(a) 配列番号2に示すアミノ酸配列からなるヒトABCG2ポリペプチド、(b) 配列番号2に示すアミノ酸配列において、12番目、126番目及び141番目を除く1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ薬物輸送能を有する(a)の同質ポリペプチド、又は(c) 哺乳動物における(a)又は(b)の相同物である。ここで、配列番号2に示すアミノ酸配列からなるヒトABCG2ポリペプチドとは化合物Aによって代表されるインドロカルバゾール系化合物に選択的な耐性を細胞に付与するポリペプチドである。同質ポリペプチドとは、ABCG2ポリペプチドの機能である薬物輸送能を有する限り配列番号2のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加される変異を有してもよいが、機能的に同等なポリペプチドにおけるアミノ酸の変異数は、通常、全アミノ酸の10%以内、好ましくは10アミノ酸以内、さらに好ましくは変異数が3アミノ酸以内（例えば、1アミノ酸）である。

【0042】

上記ABCG2遺伝子多型及びABCG2ポリペプチドの多型は特定の位置に存在し、これらの多型が特定の母集団において一定の頻度以上存在する場合に遺伝学的に重要な意味をもつこととなる。本発明の好ましい実施形態において、図1に示される具体的なSNPsが開示される。図1は本発明に係るSNP部位を表したABCG2ポリペプチドが細胞膜と結合して存在する様式を模式的に表したものである。ABCG2ポリペプチドは、N末端に細胞膜への局在に必要なリーダーシーケンス、続いてATP結合領域（アミノ酸61-270）、薬物輸送に関与する6回膜貫通ドメインを含む。図1には、4ヶ所のSNP部位を示しており、それらは、配列番号1の34番目のグアニンがアデニンに（以下「G34A」と称する。）、376番目のシトシンがチミンに（以下「C376T」と

称する。)、421番目のシトシンがアデニンに(以下「C421A」と称する。)、及び458番目のシトシンがチミンに(以下「C458T」と称する。))にそれぞれ置換した変異である。これらのSNPsに伴ってABCG2ポリペプチドのアミノ酸配列はN末端から12番目のバリンがメチオニンに置換し(以下「Val12Met」と称する。)、126番目のグルタミンが終止コドンとなり(以下「Gln126Term」と称する。)、141番目のグルタミンがリジンに置換し(以下「Gln141Lys」と称する。))及び153番目のスレオニンがメチオニン(以下「Thr153Met」と称する。))にそれぞれ置換している。Val12Metの変異は、ABCG2ポリペプチドが細胞膜へ局在するために必要なリーダーシーケンス内に存在し、Gln141Lys及びThr153Metの変異は、輸送エネルギーであるATPの結合に重要なABC(ATP結合カセット)領域内に存在するため、これらの変異がABCG2ポリペプチドの薬物輸送活性に影響を与える可能性が大きい。Gln126Termの変異は、完全なABCG2ポリペプチドが合成されないため薬物輸送活性を失うことは明らかである。

【0043】

これらの変異体ABCG2ポリペプチドの薬物輸送活性は、組換えDNA技術により変異体ABCG2ポリペプチドを発現する形質転換細胞を作製して調べることができる。本明細書において以下に詳細に説明するように、これらの形質転換細胞を用いた薬物感受性の測定によって上記Val12MetとGln141Lysの変異体ABCG2ポリペプチドの薬物輸送活性が野生型ABCG2に比べて著しく低下していることが分かる。

【0044】

あるいは、特定の薬物に高い感受性を示す被験者集団と一般集団から得た生物学的試料を分析し、本発明に係る多型性との関連を統計的に分析することによっても、これらの変異が薬物感受性と関連しているか否かを検定することができる。統計的解析は、当業者に公知のプログラム等を用いて行うことができる。

【0045】

上記核酸配列の多型を決定する方法としては、以下のような種々の公知技術を

用いて、(1) 少なくとも多型部位を含む対立遺伝子の一部の塩基配列の決定、(2) 多型部位に特異的にハイブリダイズするプローブ (アレル特異的プローブ) による検出、(3) 多型部位を含む遺伝子断片の分子量の測定等の方法により行うことができる。例えば、ダイレクト・シーケンシング法等によりゲノム DNA から直接 SNP を検出することができる。一方、特定のゲノム DNA 領域を増幅した後、上記 (1) ~ (3) の検出手段を用いることもできる。DNA を増幅するための種々の方法は当業者に公知であり、例えば、所望の DNA 断片をクローン化したり、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、連結酵素連鎖反応 (LCR)、鎖置換増殖方法 (SDA; Walker G. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 392-396 (1992))、転写反応に基づいた増殖方法 (Kwoh D. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 1173-1177 (1989))、自己持続複製反応 (Guatelli J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 1874-1878 (1990))、Q- β レプリカーゼシステム (Lizardi P. et al. Bio/Technology 6, 1197-1202 (1988))、核酸配列に基づいた増殖反応 (NASBA; Lewis R. Genetic Engineering News 12, 1 (1992))、修復連鎖反応 (RCK)、LAMP 法 (W000/28082) 等により行うことができるがこれらに限定されない。

【0046】

増殖反応産物は、種々の方法により SNP を決定することができ、例えば、塩基配列の決定、MALDI-TOF 質量分析法等による分子量の測定、及び制限酵素断片長の解析 (RFLP) 等が含まれる。一本鎖立体配置多型 (SSCP) による検出技術もまた、アクリルアミドゲル等に基づく分離方法であるが、非変性条件下で行われる。好適なキャピラリー電気泳動によって行うこともできる。この技術は、種々の DNA 断片をそれらの立体配置 (コンフォメーション) に従って識別し得る (Orita et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, (1989), Cotton Mutat. Res. 285, 125-144 (1993), Hayashi Genet. Anal. Tech. Appl. 9, 73-79 (1992))。

【0047】

TaqMan 法 (商標) と呼ばれる方法は、アレル特異的なオリゴヌクレオチドと鋳型とのハイブリダイゼーション、及び PCR 法を同時に行い、蛍光エネルギー

ギー移動現象を用いて SNP を検出する方法である (Livak et al., PCR Methods and Applications 4:357-362, 1995、及び米国特許第 5 5 2 8 8 4 8 号参照)。
。蛍光色素と消光物質により標識したアレル特異的プローブを標的部位にハイブリダイズさせて、この部位を含む領域を増幅するように設計したプライマーで PCR を行くと、プライマーからの伸長反応が進むと同時に Taq ポリメラーゼの 5' ヌクレアーゼ活性によりハイブリダイズしたプローブが切断される。蛍光色素が消光物質と離れると蛍光が生じ、また、PCR 反応により鋳型が増幅するため蛍光強度は指数関数的に増強する。2 種類のアレルに特異的なプローブを異なる蛍光色素で標識しておけば、1 回のアッセイでホモ接合体とヘテロ接合体とを区別することができる。

【0048】

DNA の増幅を伴わない種々の方法が開発されている。例えば、インベーター法 (商標) は 2 種類のオリゴヌクレオチド (インベータープローブとアレルプローブ) を用い、これらのプローブが鋳型 DNA と形成する特異的な構造を認識して切断する特殊な酵素反応に基づいており、例えば、米国特許第 5 8 4 6 7 1 7 号、第 5 6 1 4 4 0 2 号、第 5 7 1 9 0 2 8 号、第 5 5 4 1 3 1 1 号及び第 5 8 4 3 6 6 9 号等に記載されている。この方法は目的とする塩基配列を 2 種類の異なるプローブで認識する。第 1 のプローブは一般的にインベータープローブと呼ばれ、目的塩基配列の第 1 の部位に実質的に相補的である。第 2 のプローブはアレルプローブと呼ばれ、その 3' 末端側は目的塩基配列の第 2 の部位と実質的に相補的であるが、5' 末端側には鋳型と非相補的で一本鎖を形成するテール又はフラップと呼ばれる配列を含む。これらのプローブが鋳型の隣接する領域にハイブリダイズすると、SNP 部位にインベータープローブの 3' 末端が侵入し、この構造が Cleavase により切断されてフラップが遊離する。遊離したフラップはあらかじめ標識しておくことにより定量することができる。好ましくは、遊離したフラップを定量するために蛍光色素とクエンチャーで標識された第 3 の FRET (fluorescence resonance energy transfer) プローブ (フラップと相補的な配列、及び自己相補的な配列を含む) を用いることができる。遊離したフラップは FRET プローブと結合して特異的な構造を形成し、Cleavase により FRET プ

ローブの蛍光色素部分が切断されて蛍光が発生する。フラップ-FRETプローブを2組用意し、異なる蛍光色素で標識することにより、1回のアッセイで各ホモ接合体とヘテロ接合体とを区別することができる。

【0049】

MALDI-TOF質量分析法は、プライマーの蛍光標識を必要とせず、短時間で大量のサンプルを処理することができる方法である。SNP部位に隣接するプライマーを作製し、PCR増幅させたサンプルDNAを鋳型として、ddNTPを用いて1塩基分だけプライマー伸長反応を行う。伸長反応生成物の質量分析により、付加したddNTPを識別する。

【0050】

RCA(rolling circle amplification)法は、環状の一本鎖DNAを鋳型としてDNAポリメラーゼがその上を移動しながら長い相補鎖DNAを合成していくDNA増幅手段をSNPタイピングに応用したものである。SNP(アレル)の識別をRCA法による増幅の有無で行う。すなわち、ゲノムDNAとアニールし、環状になりうる一本鎖プローブ(パドロックプローブ)をゲノムDNAにハイブリダイズさせて連鎖反応を行う。プローブの端を識別したいSNPの部位としておけば、その部位がマッチしていれば連結され環状となってRCAによる増幅が起こるが、ミスマッチであれば連結されず環状とならないためRCA増幅は起こらない。この2種類の増幅反応を識別することによってSNPを決定することができる(Lizardi, P.M. et al., Nat. Genet. 19, 225 (1998))。

【0051】

多型部位を含む種々のオリゴヌクレオチドプローブをマイクロアレイ上に配置したDNAチップを用いて、PCR増幅させた蛍光標識cDNAやcRNAとハイブリダイゼーションするDNAチップ法は、多くのSNPsを迅速に検出する手段として有用である。オリゴヌクレオチドを光リソグラフィー技術によりアレイ上で合成して1チップ上に数千から数十万個のプローブを配置させたもの(Affymetrix社製、米国特許第5424186号、同第5744101号、及び同第6040138号等参照)や、あらかじめ調製したcDNAやオリゴヌクレオチドをピン又はインクジェット方式によりガラス上に固定化する方法等が知られて

いる(米国特許第6040138号参照)。

【0052】

また、上記アミノ酸配列の多型を決定する方法としては、種々の方法が公知であり、例えば、二次元電気泳動法やマイクロフルーイデイクス法 (Vreeland, Wyatt N and Barron, Annelise E, Current Opinion in Biotechnology, Vol 13, Pages 87-94 (2002)) によるプロテオーム解析、質量分析装置を用いたペプチドマッピングとアミノ酸配列分析、プロテインシークエンサーによるアミノ酸配列分析及びプロテインチップ等を用いてポリペプチドとリガンドとの相互作用を検出する方法等が挙げられる。

【0053】

二次元電気泳動法とは、一般的には、一次元目に等電点電気泳動を、二次元目に SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) を行うものであり、1枚のゲルで数千のタンパク質を分離することができる。等電点電気泳動には従来から両性担体(carrier-ampholyte)が用いられていたが、近年、固定化 pH 勾配ゲル(immobilized pH-gradient gel; IPG) ストリップが市販されるようになり、pHドリフトを起こすことなく再現性よく分離できるようになった。SDS-PAGEには、1種類の pH の緩衝液を用いる連続緩衝液系と、複数の pH の緩衝液を用いる不連続緩衝液系とがある。また、分離するタンパク質の種類によって、低 BIS 濃度ゲル電気泳動、濃度勾配ゲル電気泳動、トリシン-SDS-PAGE などを用いることができる。分離されたタンパク質は一般的にはクーマシーブルーなどの色素により染色して定量することができる。銀染色法はクーマシーブルー染色の 20～100 倍の感度でタンパク質を同定することができる。あるいは、市販されている SYPRO Ruby や SYPRO Orange などの蛍光試薬を用いてゲル上で感度よく検出できる (Patton, W.F. Electrophoresis, 21, 1123-1144 (2000))。また、ABC G2 ポリペプチドに対する抗体を用いたウエスタンブロッティング法により、ABC G2 ポリペプチドを特異的に検出することもできる。

【0054】

質量分析法は、質量(分子量)を正確に測定する技術であるが、近年、タンパ

ク質等の極性の高い（親水性の）高分子を、分解せずにイオン化する方法が実用化され、上述した核酸やタンパク質の分子量を正確に測定できるようになった。このような質量分析方法の一つとしてMALDI-TOF/MS (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight/mass spectrometry) が知られている。タンパク質試料とシナピン酸(Sinapinic acid: 3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid)等のレーザー光を吸収するマトリクスとの混合、乾燥後に強力なパルスレーザー光を照射し、マトリクスからのエネルギー移動によるタンパク質試料のイオン化を行い、初期加速による試料分子イオンの飛行時間差でイオンの分子量を分析する方法である。ペプチドを質量分析計内部で断片化し、断片の質量解析から構造情報（アミノ酸配列やアミノ酸組成など）を得るためには質量分離部を複数連結したタンデム質量分析法(MS/MS)が利用され、この目的には、エレクトロスプレーイオン化法を用いた三連四重極型やハイブリッド型、あるいはイオントラップ型分析計等も使用される。

【0055】

プロテインチップ法は基板上に並べたタンパク質やペプチド等と試料との相互作用を包括的にかつ迅速に行おうとする技術であり、基板上にはりつけるものとして、ペプチド、抗体、発現タンパク質等が開発されている。

【0056】

（ポリヌクレオチド、プライマー対、及びキット）

本発明の他の実施形態において、上記A B C G 2 遺伝子多型を含むポリヌクレオチド、上記多型を含むDNA断片を増幅するためのプライマー対、上記多型を検出するためのポリヌクレオチド及びそのためのキットが提供される。

【0057】

一つの実施形態において、本形態のポリヌクレオチドは、配列番号1の34番目、376番目、及び421番目からなる群より選択される1以上の位置における一塩基多型を有するポリヌクレオチドにおいて、前記いずれかの一塩基多型部位を含み、且つ、少なくとも10個の連続するヌクレオチド又はその相補的な配列からなるポリヌクレオチドである。従って、上記3ヶ所の一塩基多型の何れも含まないポリヌクレオチド、即ち上記3ヶ所の塩基配列が配列番号1と同一のポ

リヌクレオチドは本形態に含まれない。これらの塩基配列は好ましくは34番目のグアニンがアデニンに、376番目のシトシンがチミンに、又は421番目のシトシンがアデニンに置換されているものであるが、これら以外においてもABC G2ポリペプチドのN末端から12番目のアミノ酸のコドンがメチオニンへ、141番目のコドンがロイシンへ、又は126番目のコドンが終止コドンへ変異するような塩基配列の置換であるものを含む。

【0058】

これらのポリヌクレオチドは、天然物であっても、合成物であっても良い。例えば、cDNAやゲノムDNAを組換えDNA技術を用いて宿主細胞内で複製して製造することができる。あるいは、試験管内で合成して製造しても良い。合成方法としてはPCR等によりDNAを増幅することも、化学的に合成することもできる。また、当業者であれば、公知の方法を用いて配列番号1のABC G2遺伝子中に部位特異的に変異を導入し、本形態のポリヌクレオチドを調製することが可能である。当業者に公知の部位特異的な変異を導入する方法としては、例えば、Kunkel法(Kunkel, T. A. et al., Methods Enzymol. 154, 367-382 (1987))、ダブルプライマー法(Zoller, M. J. and Smith, M., Methods Enzymol. 154, 329-350 (1987))、カセット変異法(Wells, et al., Gene 34, 315-23 (1985))、メガプライマー法(Sarkar, G. and Sommer, S. S., Biotechniques 8, 404-407 (1990))が挙げられる。

【0059】

これらのポリヌクレオチドは、本発明に係る遺伝子多型を検出するために用いることができる。また、アンチセンスDNAとして発現を抑制するために用いることもできる。

【0060】

他の一つの実施形態において、ABC G2遺伝子と特異的にハイブリダイズし、前記遺伝子の一部からなるDNA断片を増幅するPCRプライマー対であって、増幅されたDNA断片が、配列番号1に示す塩基配列の34番目、376番目又は421番目の塩基を含むことを特徴とするPCRプライマー対が提供される。本形態のプライマー対は、ABC G2遺伝子の上記多型部位の上流及び下流の

特定の領域の各鎖と実質的に相補的になるように設計される。これらの各プライマーは、25～2500塩基対離れた領域においてハイブリダイズすることができるが、増幅産物の塩基配列の決定又は分子量の解析を容易にするため、増幅産物の大きさが100～500塩基対であることが好ましい。より好ましくは、増幅産物の大きさは80～200塩基対である。これらのオリゴヌクレオチドプライマーの長さは10～30塩基の範囲内であれば良いが、好ましくは18～25塩基のものを、更に好ましくは配列番号5と6、配列番号9と10、配列番号11と12に示したそれぞれ20～22塩基のオリゴヌクレオチドプライマーを用いることができる。これらのプライマーは増幅されたDNA断片の検出を容易にするために標識することができる。標識としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光色素、ストレプトアビジン、アビジン、磁気ビーズ、抗原及び抗体等が用いられる。

【0061】

さらに別の実施形態において、ABCG2遺伝子と特異的にハイブリダイズし、配列番号1に示す塩基配列の34番目、376番目又は421番目の位置におけるABCG2遺伝子の多型を検出することのできるポリヌクレオチドが提供される。検出方法には種々の方法があるが、例えば、インベーター法による検出を行う場合は、SNP部位から鋳型の3'側に相補的に結合するように設計されたインベータープローブとSNP部位から鋳型の5'側に相補的な配列を含み、その5'側に鋳型の配列とは無関係な配列（フラップ）を有するアレルプローブとが提供される。SNP部位の配列であるインベータープローブの3'末端は任意の塩基でよい。

【0062】

TaqManプローブは、SNP部位を含み、鋳型と相補的な約20塩基程度の長さのポリヌクレオチドである。5'末端はFAMやVIC等の蛍光色素により、また、3'末端はクエンチャー（消光物質）により標識される。

【0063】

RCA法に用いるパドロックプローブは、両端がゲノム上のSNP周辺約20塩基ずつからなり、その2つをバックボーンと呼ばれる特異的な配列が連結する

【0064】

好ましくは上記検出は、ゲノムDNAを直接又は、増幅されたDNA断片を用いて塩基配列を決定することにより行う。塩基配列決定用のシーケンスプライマーとしては、SNP部位の上流又は下流の適当な部位と実質的に相補的になるように設計される。これらのシーケンスプライマーの長さは10～30塩基の範囲内であれば良いが、好ましくは18～25塩基のものを、更に好ましくは、配列番号37、38、41、42、43、44に示した正方向プライマー（センスプライマー）又は逆方向プライマー（アンチセンスプライマー）を用いることができる。これらのオリゴヌクレオチドは当業者において公知の種々の方法で化学合成される。また、検出を容易にするために標識されたものであっても良い。標識方法としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、ストレプトアビジン、アビジン、ビオチン、磁性微粒子、抗原及び抗体等を用いることができる。

【0065】

他の実施形態において、哺乳動物の薬物輸送能を予測、検出するためのキットが提供される。このキットには、上記ABCG2多型を含むDNA断片を増幅するためのプライマー対、及び上記多型を検出するためのポリヌクレオチドの何れか又は両方が含まれる。被験試料からまず目的DNAを増幅し、増幅したDNAを用いて遺伝子多型を決定することができる。一方、DNAの増幅反応を行わずに、ゲノムDNAから直接多型を決定することも可能である。このような方法としてはインベーター法等が挙げられる。キットには、任意に選択されるものとして、DNAの抽出試薬、精製試薬、PCRのための試薬、例えば10倍濃縮緩衝液や耐熱性DNAポリメラーゼ、4種類のヌクレオチド三リン酸（dNTPs）等を含むことができる。

【0066】

（ポリペプチド）

本発明の更に他の実施形態において、ABCG2ポリペプチド又はその同質ポリペプチドに本発明に係る多型変異を有するポリペプチドが提供される。ABCG2ポリペプチドとは配列番号2に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドであ

り、その同質ポリペプチドとは A B C G 2 ポリペプチドにおいて 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ薬物輸送能を有するポリペプチドである。従来から公知の B C R P、A B C P、M X R と呼ばれている変異体ポリペプチドも含まれる。本形態の多型変異とは、配列番号 2 の 1 2 番目及び 1 4 1 番目の何れか又は両方のアミノ酸の他のアミノ酸への置換、又は配列番号 2 の 1 2 6 番目から下流のアミノ酸配列の欠失である。上記アミノ酸置換は配列番号 2 に示したアミノ酸残基以外であれば何でも良いが、好ましくは配列番号 2 の 1 2 番目及び 1 4 1 番目のアミノ酸はそれぞれメチオニン及びリジンに置換される。

【0067】

また、本形態においては、配列番号 2 の 1 2 番目及び 1 4 1 番目の何れか又は両方のアミノ酸が他のアミノ酸へ置換された前記 A B C G 2 ポリペプチド又はその同質ポリペプチドのポリペプチド断片を含む。ポリペプチド断片は少なくとも 10 個の連続するアミノ酸配列からなり、好ましくは 20 個以上の連続するアミノ酸配列であり、より好ましくは 30 個以上のアミノ酸配列の長さを有する。これらのポリペプチド又はその断片は、上記多型変異を有するポリペプチドに対する抗体を作製するために有用である。

【0068】

これらの多型変異を有するポリペプチドは、化学合成法により製造することができる他、天然のポリペプチド、又は遺伝子組み換え技術を利用した組換えポリペプチドとして調製したものをも含む。天然のポリペプチドは、例えば、本形態のヒト変異型 A B C G 2 ポリペプチドが発現していると考えられる胎盤など組織から抽出、精製したものであっても良い。一方、組換えポリペプチドは、後述するように本形態のヒト変異型 A B C G 2 ポリペプチドをコードする DNA で形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。

【0069】

発現され、又は単離されたポリペプチド又はその断片は公知の方法により検出することができ、例えば、クーマシーブルー染色、銀染色、多型変異を有するポリペプチドに特異的な抗体を使ったウエスタンブロッティング法等により検出で

きる。さらにこれらのポリペプチドは従来から公知の方法によって精製することができる。これらの方法は、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティー又は免疫クロマトグラフィー等を含む。

【0070】

(抗体)

また、本発明の一つの実施形態において、本発明に係る多型性を有する変異体 ABCG2 ポリペプチドに特異的に結合する抗体が提供される。本形態の抗体は、当業者に公知の方法（例えば、「新生化学実験講座1，タンパク質I，389-406，東京化学同人」参照）により調製することが可能である。ポリクローナル抗体の調製は、例えば、以下の如く行う。ウサギ、モルモット、マウス、ニワトリなどの免疫動物に適量の本発明の変異体 ABCG2 ポリペプチドもしくはその部分ペプチドを投与する。投与は、抗体産生を促進するアジュバント（FIA や FCA）と共に行ってもよい。投与は、通常、数週間ごとに行う。免疫を複数回行うことにより、抗体価を上昇させることができる。最終免疫後、免疫動物から採血を行うことにより抗血清が得られる。この抗血清に対し、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテインAや固定化抗原を用いたアフィニティー精製を行うことにより、ポリクローナル抗体を調製することができる。一方、モノクローナル抗体の調製は、例えば、以下の如く行う。本発明の変異体 ABCG2 ポリペプチドもしくはその部分ペプチドを、上記と同様に免疫動物に免疫し、最終免疫後、この免疫動物から脾臓またはリンパ節を採取する。この脾臓またはリンパ節に含まれる抗体産生細胞とミエローマ細胞とをポリエチレングリコールなどを用いて融合し、ハイブリドーマを調製する。目的のハイブリドーマをスクリーニングし、これを培養し、その培養上清からモノクローナル抗体を調製することができる。モノクローナル抗体の精製は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテインAや固定化抗原を用いたアフィニティー精製により行うことができる。これにより調製された抗体は、本発明の変異体 ABCG2 ポリペプチドのアフィニティー精製のために用いられる他、本発明の変異体 ABCG2 ポリペプチドの発

現量の検出などに利用することが可能である。また、該抗体により哺乳動物細胞での該本発明の変異体 A B C G 2 ポリペプチドの発現量を検出し、前記の一般式 (I) で表される化合物に対する感受性を有する哺乳動物細胞を検出することができる。また、この抗体による癌細胞や癌患者における本発明の変異体 A B C G 2 ポリペプチドの検出は、薬物感受性という患者の体質を検査して最適な薬物を投与する薬理遺伝学的な治療にも利用することが可能である。

【0071】

(形質転換細胞及び該形質転換細胞を使用する薬物輸送活性測定方法)

また、本発明は、(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるヒト A B C G 2 ポリペプチド、又は (b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、12 番目、126 番目及び 141 番目を除く 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ薬物輸送能を有する (a) の同質ポリペプチドにおいて、配列番号 2 に示すアミノ酸配列の V a l 1 2 M e t 及び G l n 1 4 1 L y s の何れか又は両方のアミノ酸置換を有する A B C G 2 ポリペプチドを発現する形質転換細胞に関する。「形質転換細胞」とは組換えベクターにより宿主細胞に外来 DNA が組み込まれた細胞であり、宿主細胞は原核細胞であっても真核細胞であっても良く、例えば細菌、酵母細胞、昆虫細胞、動物細胞など本発明の目的で使用できるならいずれの細胞であっても良い。具体的には次のような方法で組換えベクターを宿主細胞に導入し、形質転換体を得ることができる。大腸菌の形質転換は、H a n a h a n 法 (Hanahan, D., J. Mol. Biol. 166, 557-580 (1983))、電気穿孔法 (Dower, W. J. et al., Nucl. Acid Res. 16, 6127-6145 (1988)) などで行う。酵母の形質転換は、例えば、スフェロプラスト法 (Beach, D. and Nurse, P., Nature 290, 140 (1981))、酢酸リチウム法 (Okazaki, K. et al., Nucleic Acids Res. 18., 6485-6489 (1990)) などにより行われる。昆虫細胞の形質転換は、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Technology 6, 47-55 (1980)) などに記載の方法に従って行うことができる。哺乳動物細胞への組換え DNA の導入は、リン酸カルシウム法 (Graham, F. L. and van der Eb, A. J., Virology 52, 456-467 (1973))、DEAE-デキストラン法 (Sussman, D. J. and Milman, G., Mol. Cell. Biol. 4, 1641-1643 (1984))

、リポフェクション法 (Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417 (1987))、電気穿孔法 (Neumann, E. et al., EMBO J. 1, 841-845 (1982)) などで行われる。このようにして作製された形質転換細胞は、薬物輸送活性測定方法又は薬物排出機構の解析や薬物輸送能を調節する化合物のスクリーニング等に使用することができる。

【0072】

(診断方法及び診断キット)

本発明の異なる実施形態において、本発明に係る多型性を検出することにより被験者における薬物感受性を診断する方法、又はそのためのキットが提供される。薬物には癌化学療法剤が含まれ、これらについての感受性を診断することは、臨床上有用である。例えば、特定の癌患者に化学療法剤を投与した場合、患者の応答性はさまざまで、著効を示すもの、有効性の低いもの、全く効果を示さないもののように大きな違いがある。これは、患者によって遺伝的な背景が異なるため該化学療法剤を癌細胞から排出する活性が大きく異なっている可能性があるからである。従って、本形態の診断方法は、どの種類の化学療法剤又は化学療法剤群を投与するかという決定、及び／又は化学療法剤又は化学療法剤群の有効量を決定するために極めて有用である。好ましい実施形態において、本明細書の表3に示した多型を有する被験者は、上記一般式(I)で表されるインドロカルバゾール系化合物に感受性であることが示唆される。従って、上記化合物が有効な癌患者に、有効な量の該化合物による治療を施すことができ、治療効果の著しい向上と共に副作用の大幅な低減が期待される。

【0073】

本発明の別の実施形態において、本発明に係るポリヌクレオチド、プライマー対、ポリペプチド、抗体及び形質転換細胞のいずれか1以上を含んでなる薬物感受性の診断キットが提供される。この診断キットは、構成試薬を安定に保管するための適当な包装及び、本発明に係る方法を説明するための添付文書を含むことができる。さらに、適当な緩衝液、ヌクレオチド、ポリメラーゼ、例えば耐熱性ポリメラーゼや検出用の蛍光物質を含むことができる。

【0074】

(コンピュータシステム)

本発明の別の実施形態において、A B C G 2 遺伝子の少なくとも一つの S N P、又は A B C G 2 ポリペプチドに関する少なくとも一つの多型変異体ポリペプチド配列を保存し、及びこれらを表示するためのコンピュータシステムが提供される。このコンピュータシステムは、入出力装置、中央演算装置及び上記多型配列データを保存した読み取り可能な記憶媒体を含む。前記多型配列データは、被験集団における A B C G 2 遺伝子の塩基配列、遺伝子型、ハプロタイプ、又は A B C G 2 ポリペプチドのアミノ酸配列、二次元電気泳動によるスポット、質量分析データ等を含む。これらのデータは種々のプログラムによって処理され、遺伝子型決定、連鎖不平衡解析などに使用することができる。好ましい実施形態において、これらの解析結果は、哺乳動物細胞の薬物感受性の予測に用いることができる。

【0075】

【実施例】

以下に本発明の実施例として、ヒトゲノム DNA を用いて A B C G 2 遺伝子の一塩基多型を同定し、次いで変異型 A B C G 2 を発現する細胞株を作製してその機能解析を行った結果について詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0076】

[実施例 1] ヒト A B C G 2 遺伝子における S N P の同定

まず本発明者等は、ヒト由来の 30 種の癌細胞株と 149 人分のヒト臨床サンプル（白人）からゲノム DNA を抽出し、A B C G 2 遺伝子をシーケンスすることにより S N P を同定した。

【0077】

30 種の癌細胞株は、A-427、DLD-1、NCI-H69、HelaS3、PC-13、MKN-45、UM-U C-3、HCT116、PA-1、RT4、MKN1、SK-OV-3、MADH、KATOIII、U118、HS746、T24、MSTO-211H、OVCR3、Lu135、Lx-1、SCC25、Cal27、MKN-74、SCaBER、BxPC-3、Hela、J82、NCI-H 187、及び ES-2 である。これらの細胞株から Trizol reagent (GIBCO BRL 社製) を用いて DNA を抽出した。ヒト臨床サンプルは IMPATH-BCP Co. か

ら購入した。A B C G 2 遺伝子の 16 個のエクソンとその周辺のイントロンの塩基配列をダイレクト・シーケンシング法により決定した。まず最初に、表 1 に示したそれぞれのプライマー対を用いて P C R 法 (LA Taq Takara) によりゲノム DNA から 16 個のエクソンを増幅した。次に、増幅した DNA 断片を ExoSAP-IT (USB 社) で処理して残存するプライマーを消化し、不必要な d N T P s を除去した。そして、この DNA 断片と表 2 に示したセンスプライマーを用いて、ダイ・ターミネーター法 (Dynamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit アマシャム社製) でサイクルシーケンシングを行った。G-50 ゲルろ過カラムによりダイ・ターミネーターを除去した後、MegaBACE1000 キャピラリー・シーケンサー (Molecular Dynamic 社) を用いて塩基配列及び S N P s を決定した。同定された S N P s は、表 2 に示したアンチセンスプライマーを用いて塩基配列を決定し再確認した。

【0078】

【表 1】

	正方向プライマー	逆方向プライマー
エクソン 1	5'-GTGCCCACTCAAAAGGTT-3'	5'-TCCAGTCAAAGCTGTACTCTG-3'
エクソン 2	5'-ATGTATTGTGACCTAGTGTGTTG-3'	5'-AAAGTGTGAAGCCTTGAGCAGA-3'
エクソン 3	5'-AACGGAGATGTTTCACAAGA-3'	5'-TACAATAAAGCCCCAAAACA-3'
エクソン 4	5'-GAGGAAAAAGAATGGGAGAA-3'	5'-GTCTGCAAAGCCTGCTATAA-3'
エクソン 5	5'-TTCCTTCACGTTTGTGTTTCC-3'	5'-CTTCCATAAACTGGTCCCT-3'
エクソン 6	5'-GAGGTGCTTTGTATCAGGCT-3'	5'-GATCAGGCCAGTAGGTCAAC-3'
エクソン 7	5'-CTTGTAATACTTGACAGATTACCTG-3'	5'-TGTTCAAGTGACAGAATAATGGCT-3'
エクソン 8	5'-AAAGGGTAAAATTACGTGGG-3'	5'-GCAAAACAACTGACGTTTTTC-3'
エクソン 9	5'-AATGAAGGTGTTAGGGAAGC-3'	5'-CTGGCTGACACTTCTTTCAC-3'
エクソン 10	5'-TCTCCCCAAAGCACAGATAACT-3'	5'-CATTTAAAAATAATTGGGCCAGGTG-3'
エクソン 11	5'-CTAATTACCTTCCAAAGGGC-3'	5'-AAACCAGGCTGCTCTTTACT-3'
エクソン 12	5'-GCTGGGTATTTTCAAGGAT-3'	5'-AGAGAGTGCAAAATGGACAG-3'
エクソン 13	5'-TGCCTGTAGCTCTTCATCTC-3'	5'-ACGAGAGGGAACCAAAATAG-3'
エクソン 14	5'-CTTTTTGGCAGCTTTAAATGATAGC-3'	5'-AATCTTTCTCCTTTACTAGGAGGTA-3'
エクソン 15	5'-TTTACTTCTTTTGTATTGGAAGCCA-3'	5'-TAGAGGATAAATCGATTGATAGGGA-3'
エクソン 16	5'-ATCTGAAGGGTAATTATTAAAGGC-3'	5'-TGTTCCAGAAATGGTGCAAGAATTC-3'

【0079】

【表 2】

	センスプライマー	アンチセンスプライマー
エクソン 1	5'-GTGCCCACTCAAAAGGTT-3'	5'-CAAGAGTTTTTACCAAGCCA-3'
エクソン 2	5'-ATGTATTGTCACCTAGTGTG-3'	5'-GTGGCCCAATTATTTCACT-3'
エクソン 3	5'-TAAGAGTTGGTTTGCTTG-3'	5'-AACATGGTCAACTGCTACAT-3'
エクソン 4	5'-ATGTTTTGGGGGCTTTATTG-3'	5'-TATTCCAGATTCTCCCTGC-3'
エクソン 5	5'-CAGGCTTTGCAGACATCTA-3'	5'-ATTGTTATGGAAGCAACCA-3'
エクソン 6	5'-GAGGTGCTTTGTATCAGGCT-3'	5'-CAGCCTCATCACAGACATG-3'
エクソン 7	5'-CTGTCTAGAATCTGCATTT-3'	5'-AGCTGGTGCTACAAAAAT-3'
エクソン 8	5'-AAAGGGTAAAATTACGTGGG-3'	5'-TCTGGTTGTTGCTTCCTACT-3'
エクソン 9	5'-GTTAGGGAAGCATCCAAGA-3'	5'-AGGGAAGCTTCCAAAAGTA-3'
エクソン 10	5'-TCTCCCAAGACACAGATAACT-3'	5'-TGGTGGTGATGTCTGTAGT-3'
エクソン 11	5'-CTAATTACCTTCCAAAGGGC-3'	5'-GCTCAGGATTTTCTTCCCTA-3'
エクソン 12	5'-CTGGAAGTGTTCAGGAG-3'	5'-AGAGAGTGCAAAATGGACAG-3'
エクソン 13	5'-TGCCTGTAGCTCTTCATCTC-3'	5'-ATAAGGGCAAAGAGGAAAGT-3'
エクソン 14	5'-TTTGTCTCTCTTTAAACCG-3'	5'-AATCTTTCTCCTTTACTAGGAGTA-3'
エクソン 15	5'-TTTACTTCTTTGTATTGGAAGCCA-3'	5'-AAAAGGCCCAAAACAATAAG-3'
エクソン 16-1	5'-ATCTGAAGGGTAATTATTAAGGC-3'	5'-CAGGAGTTTCCAGAATTCAA-3'
エクソン 16-2	5'-TGTTGTTTTCTGTTCCCTTG-3'	5'-TGTTCCAGAAATGGTGCAAGAATTC-3'

【0080】

上記塩基配列の決定に基づいて、ヒト由来の30種の癌細胞株と149人分のヒト臨床サンプル（白人）中に同定されたSNPsの結果を表3にまとめた。表3において、ドメイン欄に記載したABCはATP結合カセット(ATP binding cassette)を、ECは細胞外領域(extra cellular region)を、TMは膜貫通領域(trans membrane)を、及びUTRは非翻訳領域(untranslated region)を表す。例えば、翻訳開始コドンの最初のアデニンを1番目として数えて変異部位を示すと、G34Aは、30種の癌細胞株の中で5株(16.7%)に認められ、149人のヒト臨床サンプルの中では29人(19.5%)に認められた。また、イントロン3の5'側から数えて10番目のアデニンがグアニンに置換した変異は、「A+10G」と表し、イントロン13の3'側から数えて21番目のシトシンがチミンに置換した変異は「C-21T」と表した。表3の中のいくつかのSNPsの位置をABC G2ポリペプチドの模式的な構造と共に図1に示した。これらのSNPsの内、G34Aは、ABC G2ポリペプチドの細胞膜への局在に重要なリーダーシクエンス内に存在し、また、C421Aは輸送エネルギーである

A T P の結合に重要な A T P 結合カセット (A B C) 領域内に存在する変異であった。従って、これらの変異は A B C G 2 ポリペプチドの活性に影響を与える可能性が高い。また、C 3 7 6 T は A B C 領域内に存在する終止コドンへの変異であり、A B C G 2 が活性を失うことは明らかな変異である。なお、表 3 において、C 4 9 6 G、T 6 2 3 C、A 1 4 4 4 G、及び G 1 4 4 5 C の各 S N P は、それぞれ NCBI SNP CLUSTER ID: rs1061017、NCBI SNP CLUSTER ID: rs1061018、Cancer Res. 59, 8-13, 1999、及び Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 15665-15670, 1998 に報告されているが、上記細胞株及びヒト由来のサンプル中には検出されなかった。

【0081】

【表 3】

一塩基多型	アミノ酸置換への影響	存在位置	ドメイン	30 種の細胞株における頻度	149 人のヒト臨床サンプルにおける頻度
G34A	Val12Met	エクソン2	リーダー配列	5 (16.7%)	29 (19.5%)
A+10G	—	イントロン3	—	ND	25 (16.8%)
C369T	Tyr123Tyr	エクソン4	ABC	0	1 (0.7%)
C376T	Gln126Term	エクソン4	ABC	1 (3.3%)	0
C421A	Gln141Lys	エクソン5	ABC	6 (20%)	24 (16.1%)
C458T	Thr153Met	エクソン5	ABC	1 (3.3%)	0
C474T	Asp158Asp	エクソン5	ABC	0	1 (0.7%)
C496G	Gln166Glu	エクソン5	ABC	0	0
T623C	Phe208Ser	エクソン6	ABC	0	0
A+20G	—	イントロン11	—	ND	44 (29.5%)
A1444G	Arg482Gly	エクソン12	TM3	0	0
G1445C	Arg482Thr	エクソン12	TM3	0	0
C-21T	—	イントロン13	—	ND	36 (24.2%)
A1768T	Asp590Tyr	エクソン15	EC3	0	1 (0.7%)
G2237T	—	エクソン16	3'UTR	1 (3.3%)	0
G2393T	—	エクソン16	3'UTR	1 (3.3%)	0

【0082】

[実施例 2] 変異型 A B C G 2 を発現する細胞株の作製

実施例 1 で同定された多型性変異体のうち、A B C G 2 ポリペプチドの機能が影響を受ける可能性が高い 2 つの変異体 G 3 4 A 及び C 4 2 1 A を作製し、動物細胞へ導入することでその機能解析を試みた。変異型 A B C G 2 遺伝子の作製は

、PCR法を用いて点突然変異を導入した。目的の変異が導入されたことを塩基配列の決定によって確認した後、遺伝子発現ベクターpcDNA3.1(+)へクローン化して各変異体の発現プラスミドを作製した。対照として、野生型(WT)のABCG2を発現するプラスミド、ABCG2遺伝子を含まないベクターのみのプラスミドpcDNA3.1(+)を用い、これら4種類の発現プラスミドを動物細胞(ブタ腎臓細胞株)LLC-PK1へ、リポフェクション法(Lipofectamine; GIBCO BRL社)により遺伝子導入した。1500 μ g/ml (マイクログラム/ミリリットル)のGeneticin(GIBCO BRL)を含む培地で2週間培養して安定な形質転換株を選択し、細胞株を樹立した。各細胞株のABCG2の発現量を調べるために、各形質転換細胞及びHela細胞からTrizol(GIBCO BRL)を用いて全RNAを抽出した。各細胞クローンから抽出した7mgの全RNAと、32Pで標識したABCG2完全長cDNA(2.2kb)プローブを用いてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。ABCG2の発現量の違いによる影響をなくするためにABCG2 mRNAの発現量が同等なクローンを選択し、その結果を図2に示した。図2においてレーン2~4の形質転換細胞は、それぞれ同程度のABCG2 mRNAを発現していることが分かる。なお、各細胞で発現するmRNAの内部標準としてGAPDHを用いた。レーン5はベクターのみによって形質転換された対照クローンでありABCG2 mRNAが発現していないことが分かる。

【0083】

[実施例3]化合物Bに対する耐性度の評価

実施例2で選択したABCG2 mRNAの発現量がほぼ同等な形質転換細胞を、1mMのL-グルタミン、50 units/mlのペニシリン、50 mg/mlのストレプトマイシン、及び10容量%の牛胎児血清を添加した199培地で培養した。全ての培養は、5%炭酸ガスを含む湿潤化空気内で37℃にて保温して行った。抗癌剤に対する細胞毒性は、スルホローダミンB染色法を用いて比較した。即ち、種々の濃度の化合物B又はカンプトテシンを添加した培養液で4種類の形質転換細胞クローンを72時間、37℃で培養後、トリクロロ酢酸で固定化し、1%酢酸溶液に溶かした0.4%スルホローダミンBで染色した。結合しなかった色素を1%酢酸溶液で4回洗浄して除去した後、ポリペプチドに結合した色素を緩衝作

用のない 10 mM トリス塩基で抽出した。抽出液の 564 nm の吸光度をプレートリーダーで測定し、IC₅₀ を決定した。その結果を表 4 に示す。野生型 ABCG2 を発現する細胞株 (1-58) はベクターだけを遺伝子導入した細胞株 (C4) と比較して 400 倍以上化合物 B への耐性度が増加していた。それに対し、ABCG2 のリーダーシーケンス内に Val12Met の変異を有する細胞株 (2-51)、及び ABC 領域内に Gln141Lys の変異を有する細胞株 (3-28) の化合物 B への耐性度は、C4 よりそれぞれ 7.7 倍、48.2 倍増加したが、野生型と比較すると 1/10 程度若しくはそれ以下であった。ABCG2 の基質にはならないカンプトテシンに対しては各細胞間で耐性度に有意な差は無かった。これらの結果より、2 種類の変異体 ABCG2 (Val12Met 及び Gln141Lys) は野生型 ABCG2 に比べて明らかにトポイソメラーゼ阻害剤である化合物 B の細胞外への排出能力が低下していることが示唆される。

【0084】

【表 4】化合物 B 感受性に対する SNPs の影響

クローン No.	C4	1-58	2-51	3-28
SNP 部位	—	野生型	リーダー配列 (Val12Met)	ABCDメイン (Gln141Lys)
発現レベル*	0	1.90	2.08	1.95
カンプトテシン (μM)	0.0087	0.0213	0.0122	0.0268
化合物 B (μM)	0.122	>50	0.94	5.88
増加倍数	1.0	>409	7.7	48.2

*各細胞株の ABCG2 発現量は HeLa 細胞 (= 1.0) に対して標準化した。

【0085】

【発明の効果】

本発明の方法を使用することにより、哺乳動物細胞の薬物輸送能を予測することができ、これによって、抗癌剤等の種々の薬物に対する患者の感受性を診断して治療方法の指針とすることができる。すなわち、癌治療における抗癌剤の選択、特にインドロカルバゾール系化合物に感受性の高い癌細胞を検出することにより、該化合物の選択的な治療応用が可能となる。更に、癌治療におけるインドロ

カルバゾール系化合物の最適投与量を見出すと共に、該化合物の副作用を軽減することによって、インドロカルバゾール系化合物の極めて有効な使用方法を提供するものである。

【0086】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> BANYU PHARMACEUTICAL CO., LTD

<120> A method for predicting a drug transporting capability
by ABCG2 polymorphisms

<130> P7194GN

<140>

<141>

<160> 68

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1968

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1965)

<400> 1

atg tct tcc agt aat gtc gaa gtt ttt atc cca gtg tca caa gga aac 48

Met Ser Ser Ser Asn Val Glu Val Phe Ile Pro Val Ser Gln Gly Asn

1

5

10

15

acc aat ggc ttc ccc gcg aca gct tcc aat gac ctg aag gca ttt act 96

Thr Asn Gly Phe Pro Ala Thr Ala Ser Asn Asp Leu Lys Ala Phe Thr

20

25

30

gaa gga gct gtg tta agt ttt cat aac atc tgc tat cga gta aaa ctg 144

Glu Gly Ala Val Leu Ser Phe His Asn Ile Cys Tyr Arg Val Lys Leu

35

40

45

aag agt ggc ttt cta cct tgt cga aaa cca gtt gag aaa gaa ata tta 192

Lys Ser Gly Phe Leu Pro Cys Arg Lys Pro Val Glu Lys Glu Ile Leu

50

55

60

tcg aat atc aat ggg atc atg aaa cct ggt ctc aac gcc atc ctg gga 240

Ser Asn Ile Asn Gly Ile Met Lys Pro Gly Leu Asn Ala Ile Leu Gly

65

70

75

80

ccc aca ggt gga ggc aaa tct tcg tta tta gat gtc tta gct gca agg 288

Pro Thr Gly Gly Gly Lys Ser Ser Leu Leu Asp Val Leu Ala Ala Arg

85

90

95

aaa gat cca agt gga tta tct gga gat gtt ctg ata aat gga gca ccg 336

Lys Asp Pro Ser Gly Leu Ser Gly Asp Val Leu Ile Asn Gly Ala Pro

100

105

110

cga cct gcc aat ttc aaa tgt aat tca ggt tac gtg gta caa gat gat 384

Arg Pro Ala Asn Phe Lys Cys Asn Ser Gly Tyr Val Val Gln Asp Asp

115

120

125

gtt gtg atg ggc act ctg acg gtg aga gaa aac tta cag ttc tca gca 432

Val Val Met Gly Thr Leu Thr Val Arg Glu Asn Leu Gln Phe Ser Ala

130

135

140

gct ctt cgg ctt gca aca act atg acg aat cat gaa aaa aac gaa cgg 480

Ala Leu Arg Leu Ala Thr Thr Met Thr Asn His Glu Lys Asn Glu Arg

145

150

155

160

att aac agg gtc att caa gag tta ggt ctg gat aaa gtg gca gac tcc 528

Ile Asn Arg Val Ile Gln Glu Leu Gly Leu Asp Lys Val Ala Asp Ser

165

170

175

aag gtt gga act cag ttt atc cgt ggt gtg tct gga gga gaa aga aaa 576

Lys Val Gly Thr Gln Phe Ile Arg Gly Val Ser Gly Gly Glu Arg Lys

180

185

190

agg act agt ata gga atg gag ctt atc act gat cct tcc atc ttg ttc 624

Arg Thr Ser Ile Gly Met Glu Leu Ile Thr Asp Pro Ser Ile Leu Phe

195

200

205

ttg gat gag cct aca act ggc tta gac tca agc aca gca aat gct gtc 672

Leu Asp Glu Pro Thr Thr Gly Leu Asp Ser Ser Thr Ala Asn Ala Val

210

215

220

ctt ttg ctc ctg aaa agg atg tct aag cag gga cga aca atc atc ttc 720
Leu Leu Leu Leu Lys Arg Met Ser Lys Gln Gly Arg Thr Ile Ile Phe
225 230 235 240

tcc att cat cag cct cga tat tcc atc ttc aag ttg ttt gat agc ctc 768
Ser Ile His Gln Pro Arg Tyr Ser Ile Phe Lys Leu Phe Asp Ser Leu
245 250 255

acc tta ttg gcc tca gga aga ctt atg ttc cac ggg cct gct cag gag 816
Thr Leu Leu Ala Ser Gly Arg Leu Met Phe His Gly Pro Ala Gln Glu
260 265 270

gcc ttg gga tac ttt gaa tca gct ggt tat cac tgt gag gcc tat aat 864
Ala Leu Gly Tyr Phe Glu Ser Ala Gly Tyr His Cys Glu Ala Tyr Asn
275 280 285

aac cct gca gac ttc ttc ttg gac atc att aat gga gat tcc act gct 912
Asn Pro Ala Asp Phe Phe Leu Asp Ile Ile Asn Gly Asp Ser Thr Ala
290 295 300

gtg gca tta aac aga gaa gaa gac ttt aaa gcc aca gag atc ata gag 960
Val Ala Leu Asn Arg Glu Glu Asp Phe Lys Ala Thr Glu Ile Ile Glu
305 310 315 320

cct tcc aag cag gat aag cca ctc ata gaa aaa tta gcg gag att tat 1008
Pro Ser Lys Gln Asp Lys Pro Leu Ile Glu Lys Leu Ala Glu Ile Tyr
325 330 335

gtc aac tcc tcc ttc tac aaa gag aca aaa gct gaa tta cat caa ctt 1056

Val Asn Ser Ser Phe Tyr Lys Glu Thr Lys Ala Glu Leu His Gln Leu
340 345 350

tcc ggg ggt gag aag aag aag aag atc aca gtc ttc aag gag atc agc 1104
Ser Gly Gly Glu Lys Lys Lys Lys Ile Thr Val Phe Lys Glu Ile Ser
355 360 365

tac acc acc tcc ttc tgt cat caa ctc aga tgg gtt tcc aag cgt tca 1152
Tyr Thr Thr Ser Phe Cys His Gln Leu Arg Trp Val Ser Lys Arg Ser
370 375 380

ttc aaa aac ttg ctg ggt aat ccc cag gcc tct ata gct cag atc att 1200
Phe Lys Asn Leu Leu Gly Asn Pro Gln Ala Ser Ile Ala Gln Ile Ile
385 390 395 400

gtc aca gtc gta ctg gga ctg gtt ata ggt gcc att tac ttt ggg cta 1248
Val Thr Val Val Leu Gly Leu Val Ile Gly Ala Ile Tyr Phe Gly Leu
405 410 415

aaa aat gat tct act gga atc cag aac aga gct ggg gtt ctc ttc ttc 1296
Lys Asn Asp Ser Thr Gly Ile Gln Asn Arg Ala Gly Val Leu Phe Phe
420 425 430

ctg acg acc aac cag tgt ttc agc agt gtt tca gcc gtg gaa ctc ttt 1344
Leu Thr Thr Asn Gln Cys Phe Ser Ser Val Ser Ala Val Glu Leu Phe
435 440 445

gtg gta gag aag aag ctc ttc ata cat gaa tac atc agc gga tac tac 1392
Val Val Glu Lys Lys Leu Phe Ile His Glu Tyr Ile Ser Gly Tyr Tyr

450

455

460

aga gtg tca tct tat ttc ctt gga aaa ctg tta tct gat tta tta ccc 1440

Arg Val Ser Ser Tyr Phe Leu Gly Lys Leu Leu Ser Asp Leu Leu Pro

465

470

475

480

atg agg atg tta cca agt att ata ttt acc tgt ata gtg tac ttc atg 1488

Met Arg Met Leu Pro Ser Ile Ile Phe Thr Cys Ile Val Tyr Phe Met

485

490

495

tta gga ttg aag cca aag gca gat gcc ttc ttc gtt atg atg ttt acc 1536

Leu Gly Leu Lys Pro Lys Ala Asp Ala Phe Phe Val Met Met Phe Thr

500

505

510

ctt atg atg gtg gct tat tca gcc agt tcc atg gca ctg gcc ata gca 1584

Leu Met Met Val Ala Tyr Ser Ala Ser Ser Met Ala Leu Ala Ile Ala

515

520

525

gca ggt cag agt gtg gtt tct gta gca aca ctt ctc atg acc atc tgt 1632

Ala Gly Gln Ser Val Val Ser Val Ala Thr Leu Leu Met Thr Ile Cys

530

535

540

ttt gtg ttt atg atg att ttt tca ggt ctg ttg gtc aat ctc aca acc 1680

Phe Val Phe Met Met Ile Phe Ser Gly Leu Leu Val Asn Leu Thr Thr

545

550

555

560

att gca tct tgg ctg tca tgg ctt cag tac ttc agc att cca cga tat 1728

Ile Ala Ser Trp Leu Ser Trp Leu Gln Tyr Phe Ser Ile Pro Arg Tyr

565

570

575

gga ttt acg gct ttg cag cat aat gaa ttt ttg gga caa aac ttc tgc 1776

Gly Phe Thr Ala Leu Gln His Asn Glu Phe Leu Gly Gln Asn Phe Cys

580

585

590

cca gga ctc aat gca aca gga aac aat cct tgt aac tat gca aca tgt 1824

Pro Gly Leu Asn Ala Thr Gly Asn Asn Pro Cys Asn Tyr Ala Thr Cys

595

600

605

act ggc gaa gaa tat ttg gta aag cag ggc atc gat ctc tca ccc tgg 1872

Thr Gly Glu Glu Tyr Leu Val Lys Gln Gly Ile Asp Leu Ser Pro Trp

610

615

620

ggc ttg tgg aag aat cac gtg gcc ttg gct tgt atg att gtt att ttc 1920

Gly Leu Trp Lys Asn His Val Ala Leu Ala Cys Met Ile Val Ile Phe

625

630

635

640

ctc aca att gcc tac ctg aaa ttg tta ttt ctt aaa aaa tat tct taa 1968

Leu Thr Ile Ala Tyr Leu Lys Leu Leu Phe Leu Lys Lys Tyr Ser

645

650

655

<210> 2

<211> 655

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Ser Ser Asn Val Glu Val Phe Ile Pro Val Ser Gln Gly Asn

1

5

10

15

Thr Asn Gly Phe Pro Ala Thr Ala Ser Asn Asp Leu Lys Ala Phe Thr

20

25

30

Glu Gly Ala Val Leu Ser Phe His Asn Ile Cys Tyr Arg Val Lys Leu

35

40

45

Lys Ser Gly Phe Leu Pro Cys Arg Lys Pro Val Glu Lys Glu Ile Leu

50

55

60

Ser Asn Ile Asn Gly Ile Met Lys Pro Gly Leu Asn Ala Ile Leu Gly

65

70

75

80

Pro Thr Gly Gly Gly Lys Ser Ser Leu Leu Asp Val Leu Ala Ala Arg

85

90

95

Lys Asp Pro Ser Gly Leu Ser Gly Asp Val Leu Ile Asn Gly Ala Pro

100

105

110

Arg Pro Ala Asn Phe Lys Cys Asn Ser Gly Tyr Val Val Gln Asp Asp

115

120

125

Val Val Met Gly Thr Leu Thr Val Arg Glu Asn Leu Gln Phe Ser Ala

130

135

140

Ala Leu Arg Leu Ala Thr Thr Met Thr Asn His Glu Lys Asn Glu Arg

145

150

155

160

Ile Asn Arg Val Ile Gln Glu Leu Gly Leu Asp Lys Val Ala Asp Ser
165 170 175

Lys Val Gly Thr Gln Phe Ile Arg Gly Val Ser Gly Gly Glu Arg Lys
180 185 190

Arg Thr Ser Ile Gly Met Glu Leu Ile Thr Asp Pro Ser Ile Leu Phe
195 200 205

Leu Asp Glu Pro Thr Thr Gly Leu Asp Ser Ser Thr Ala Asn Ala Val
210 215 220

Leu Leu Leu Leu Lys Arg Met Ser Lys Gln Gly Arg Thr Ile Ile Phe
225 230 235 240

Ser Ile His Gln Pro Arg Tyr Ser Ile Phe Lys Leu Phe Asp Ser Leu
245 250 255

Thr Leu Leu Ala Ser Gly Arg Leu Met Phe His Gly Pro Ala Gln Glu
260 265 270

Ala Leu Gly Tyr Phe Glu Ser Ala Gly Tyr His Cys Glu Ala Tyr Asn
275 280 285

Asn Pro Ala Asp Phe Phe Leu Asp Ile Ile Asn Gly Asp Ser Thr Ala
290 295 300

Val Ala Leu Asn Arg Glu Glu Asp Phe Lys Ala Thr Glu Ile Ile Glu
305 310 315 320

Pro Ser Lys Gln Asp Lys Pro Leu Ile Glu Lys Leu Ala Glu Ile Tyr
325 330 335

Val Asn Ser Ser Phe Tyr Lys Glu Thr Lys Ala Glu Leu His Gln Leu
340 345 350

Ser Gly Gly Glu Lys Lys Lys Lys Ile Thr Val Phe Lys Glu Ile Ser
355 360 365

Tyr Thr Thr Ser Phe Cys His Gln Leu Arg Trp Val Ser Lys Arg Ser
370 375 380

Phe Lys Asn Leu Leu Gly Asn Pro Gln Ala Ser Ile Ala Gln Ile Ile
385 390 395 400

Val Thr Val Val Leu Gly Leu Val Ile Gly Ala Ile Tyr Phe Gly Leu
405 410 415

Lys Asn Asp Ser Thr Gly Ile Gln Asn Arg Ala Gly Val Leu Phe Phe
420 425 430

Leu Thr Thr Asn Gln Cys Phe Ser Ser Val Ser Ala Val Glu Leu Phe
435 440 445

Val Val Glu Lys Lys Leu Phe Ile His Glu Tyr Ile Ser Gly Tyr Tyr
450 455 460

Arg Val Ser Ser Tyr Phe Leu Gly Lys Leu Leu Ser Asp Leu Leu Pro

465

470

475

480

Met Arg Met Leu Pro Ser Ile Ile Phe Thr Cys Ile Val Tyr Phe Met

485

490

495

Leu Gly Leu Lys Pro Lys Ala Asp Ala Phe Phe Val Met Met Phe Thr

500

505

510

Leu Met Met Val Ala Tyr Ser Ala Ser Ser Met Ala Leu Ala Ile Ala

515

520

525

Ala Gly Gln Ser Val Val Ser Val Ala Thr Leu Leu Met Thr Ile Cys

530

535

540

Phe Val Phe Met Met Ile Phe Ser Gly Leu Leu Val Asn Leu Thr Thr

545

550

555

560

Ile Ala Ser Trp Leu Ser Trp Leu Gln Tyr Phe Ser Ile Pro Arg Tyr

565

570

575

Gly Phe Thr Ala Leu Gln His Asn Glu Phe Leu Gly Gln Asn Phe Cys

580

585

590

Pro Gly Leu Asn Ala Thr Gly Asn Asn Pro Cys Asn Tyr Ala Thr Cys

595

600

605

Thr Gly Glu Glu Tyr Leu Val Lys Gln Gly Ile Asp Leu Ser Pro Trp

610

615

620

Gly Leu Trp Lys Asn His Val Ala Leu Ala Cys Met Ile Val Ile Phe
625 630 635 640

Leu Thr Ile Ala Tyr Leu Lys Leu Leu Phe Leu Lys Lys Tyr Ser
645 650 655

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Exon 1 forward
primer

<400> 3

gtgccctc aaaaggtt

18

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Exon 1 reverse
primer

<400> 4

tccagtcaaa gctgtactct g

21

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 2 forward
primer

<400> 5

atgtattgtc acctagtgtt tg

22

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 2 reverse
primer

<400> 6

aaagtgtgaa gccttgagca ga

22

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 3 forward
primer

<400> 7

aacggagatg tttcacaaga

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 3 reverse
primer

<400> 8

tacaataaag ccccaaaaca

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 4 forward
primer

<400> 9

gaggaaaaag aatgggagaa

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 4 reverse
primer

<400> 10

gtctgcaaag cctgctataa

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Exon 5 forward
primer

<400> 11

ttccttcacc tttcttttcc

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Exon 5 reverse
primer

<400> 12

cttcataaa actggtcct

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Exon 6 forward

primer

<400> 13

gaggtgcttt gtatcaggct

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Exon 6 reverse

primer

<400> 14

gatcaggcca gtaggtcaac

20

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Exon 7 forward

primer

<400> 15

cttgtaaata cttgcagatt acctg

25

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 7 reverse
primer

<400> 16

tgttcaagtg acagaataaa tggct

25

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 8 forward
primer

<400> 17

aaagggtaaa attacgtggg

20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 8 reverse
primer

<400> 18

gcaaacaaac tgacgttttc

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 9 forward
primer

<400> 19

aatgaagtg ttagggaagc

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 9 reverse
primer

<400> 20

ctggctgaca cttctttcac

20

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 10 forward
primer

<400> 21

tctccccaaa gcacagataa ct

22

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 10 reverse
primer

<400> 22

catttaaaaa taattgggcc aggtg

25

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 11 forward
primer

<400> 23

ctaattacct tccaaagggc

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 11 reverse
primer

<400> 24

aaaccaggct gctctttact

20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 12 forward
primer

<400> 25

gctgggtatt tttcaaggat

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 12 reverse
primer

<400> 26

agagagtgc aatggacag

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 13 forward
primer

<400> 27

tgccgtgtagc tcttcatctc

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 13 reverse
primer

<400> 28

acgagaggga accaaaaatag

20

<210> 29

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 14 forward
primer

<400> 29

ctttttggca gctttaaatg atagc

25

<210> 30

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 14 reverse
primer

<400> 30

aatctttctc ctttactagg aggta

25

<210> 31

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 15 forward
primer

<400> 31

tttacttctt ttgtattgga agcca

25

<210> 32

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 15 reverse
primer

<400> 32

tagaggataa atcgattgat aggga

25

<210> 33

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 16 forward
primer

<400> 33

atctgaaggg gtaattatta aaggc

25

<210> 34

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 16 reverse
primer

<400> 34

tgttccagaa atggtgcaag aattc

25

<210> 35

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 1 sense
primer

<400> 35

gtgccactc aaaagggtt

18

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Exon 1
antisense primer

<400> 36

caagagtttt taccaacc

20

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Exon 2 sense
primer

<400> 37

atgtattgtc acctagtgtt tg

22

<210> 38

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 2
antisense primer

<400> 38

gtggcccaat tatttcact

19

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 3 sense
primer

<400> 39

taagagttgg tttgtgcttg

20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 3
antisense primer

<400> 40

aacatggtca actgctacat

20

<210> 41

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 4 sense
primer

<400> 41

atgttttggg gctttattg

19

<210> 42

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 4

antisense primer

<400> 42

tattccagat tctccctgc

19

<210> 43

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 5 sense
primer

<400> 43

caggctttgc agacatcta

19

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 5
antisense primer

<400> 44

attgttatgg aaagcaacca

20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 6 sense
primer

<400> 45

gaggtgcttt gtatcaggct

20

<210> 46

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 6
antisense primer

<400> 46

caccctcatc acagacatc

19

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 7 sense
primer

<400> 47

ctgtcctaga atctgcattt

20

<210> 48

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 7
antisense primer

<400> 48

agctgggtgct acaaaaat

18

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 8 sense
primer

<400> 49

aaagggtaaa attacgtggg

20

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 8
antisense primer

<400> 50

tctggttggt gcttcctact

20

<210> 51

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 9 sense
primer

<400> 51

gttagggaag .catccaaga

19

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 9
antisense primer

<400> 52

agggaagctt tccaaaagta

20

<210> 53

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 10 sense
primer

<400> 53

tctccccaaa gcacagataa ct

22

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Exon 10
antisense primer

<400> 54

tggtggtgga tgtctgtagt

20

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Exon 11 sense
primer

<400> 55

ctaattacct tccaaagggc

20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 11
antisense primer

<400> 56

gctcaggatt ttcttccta

20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 12 sense
primer

<400> 57

ctggactgag tggtcaggag

20

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 12
antisense primer

<400> 58

agagagtgc aaatggacag

20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 13 sense
primer

<400> 59

tgccctgtagc tcttcatctc

20

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Exon 13
antisense primer

<400> 60

ataagggcaa agaggaaagt

20

<210> 61

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Exon 14 sense
primer

<400> 61

tttgttcttc ctttaaaacc g

21

<210> 62

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Exon 14
antisense primer

<400> 62

aatctttctc ctttactagg aggta

25

<210> 63

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Exon 15 sense
primer

<400> 63

tttacttctt ttgtattgga agcca

25

<210> 64

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Exon 15
antisense primer

<400> 64

aaaaggccca aaacaataag

20

<210> 65

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 16-1 sense
primer

<400> 65

atctgaaggg gtaattatta aaggc

25

<210> 66

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 16-1
antisense primer

<400> 66

caggagtttc cagaattcaa

20

<210> 67

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 16-2 sense
primer

<400> 67

tgttggttttc tgttcccttg

20

<210> 68

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Exon 16-2
antisense primer

<400> 68

tgttccagaa atggtgcaag aattc

25

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明に係る一塩基多型の位置を示した A B C G 2 ポリペプチドの模式図であ

る。

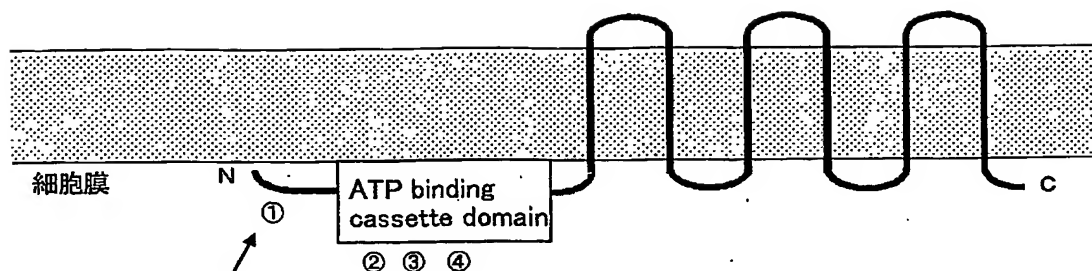
【図 2】

種々の形質転換細胞において ABCG2 mRNA の量を調べたノーザンブロット解析の結果である。

【書類名】

図面

【図1】



リーダーシーケンス

① 34G→A (Val12Met)

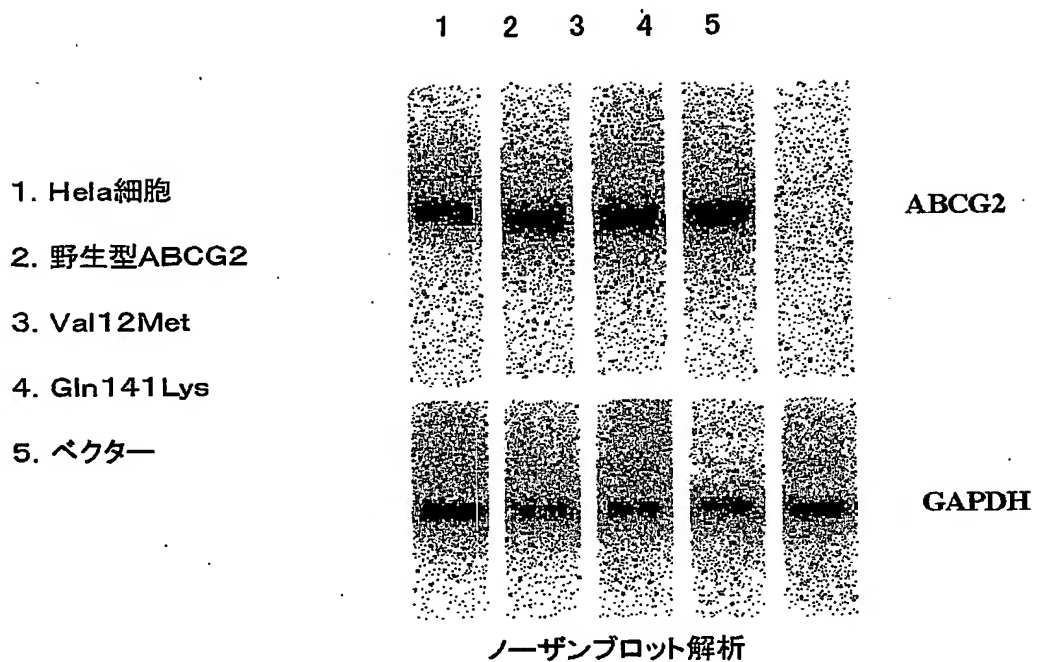
ABCDメイン

② 376C→T (Gln126Term)

③ 421C→A (Gln141Lys)

④ 458C→T (Thr152Met)

【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

インドロカルバゾール系化合物の細胞内蓄積に関連する A B C G 2 ポリペプチドとそれをコードするポリヌクレオチドの多型、及びその検出方法を提供すること。

【解決手段】

哺乳動物から試料を採取し、A B C G 2 遺伝子における核酸配列の多型、又は A B C G 2 ポリペプチドにおけるアミノ酸配列の多型を決定する。本発明の好ましい実施形態において、前記核酸配列の多型は配列番号 1 の 3 4 番目、3 7 6 番目及び 4 2 1 番目からなる群より選択される位置における 1 以上の一塩基多型であり、前記アミノ酸配列の多型は配列番号 2 の 1 2 番目、1 2 6 番目及び 1 4 1 番目からなる群より選択される位置における 1 以上のアミノ酸の多型である。

【選択図】

図 1

特願2002-175806

出願人履歴情報

識別番号

[000005072]

1. 変更年月日

1990年 8月 7日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋本町2丁目2番3号

氏 名

萬有製薬株式会社